Charakterisierung der Satelliten-DNA der Ratte und Darstellung von Heterochromatin mit Hilfe von Restriktionsnukleasen

Walter Greil

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0019

Aus dem Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München

Direktor (Vorstände): Prof.Dr.Dr. W.Neupert, Prof.Dr. E.M.Klingenberg, Prof.Dr. F.Miller, Prof.Dr. H.G.Zachau

Charakterisierung der Satelliten-DNA der Ratte und Darstellung von Heterochromatin mit Hilfe von Restriktionsnukleasen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Walter Greil
aus
München

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. H.G.Zachau
Dekan: Prof.Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.84

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Mai 1976 bis August 1977 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich für die Förderung dieser Arbeit. Herrn Priv.-Doz.Dr. T. Igo-Kemenes danke ich herzlich für die Anregungen und Diskussionen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Bei den Kollegen der Abteilung möchte ich mich für Nukleinsäure- und Nukleasepräparationen sowie für anregende Diskussionen bedanken.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

T. Igo-Kemenes, W. Greil und H.G. Zachau, Nucl. Acids Res. 4, 3387-3400, 1977

Meinen Eltern

und

meiner Tochter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	ERGEBNISSE	5
2.1	Spaltung von Ratten-DNA mit Restriktionsnukleasen	5
2.1.1	Isolierung von Ratten-DNA	6
2.1.2	Kinetik der Spaltung mit Restriktionsnuklease Eco R I	6
2.1.3	Kinetik der Spaltung mit Restriktionsnuklease Hind III	11
2.2	Kartierung der Satelliten-DNA mit Restriktionsnukleasen Eco R I und Hind III	14
2.2.1	Isolierung und Nachspaltung von Restriktionsfragmenten	15
2.2.2	Physikalische Karte der Satelliten-DNA der Ratte	19
2.3	Präparation von löslichem Chromatin aus Rattenleberzellkernen mit Eco R I	21
2.3.1	Schema der Solubilisierung und Fraktionierung von Chromatin	23
2.3.2	Freisetzung von löslichem Chromatin nach Inkubation von Zellkernen mit Eco R I	25
2.3.3	Einfluß von Triton X-100 auf die Verdauung von Zellkernen mit Eco R I und Mikrokokkus-Nuklease	30

		Seite
2.3.4	Analyse und Vergleich der DNA in den verschiedenen Chromatin-Fraktionen	33
2.3.5	Proteinverteilung nach Fraktionierung von Chromatin	38
2.4	Anreicherung und Reinigung von Satelliten-Chromatin durch Saccharosegradientenzentrifugation	41
2.5	Nachspaltung von löslichem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase II	44
3	DISKUSSION	49
3.1	Charakterisierung der Satelliten-DNA der Ratte	49
3.2	Chromatinsolubilisierung und Isolierung von Satelliten-Chromatin	50
4	MATERIALIEN UND METHODEN	53
4.1	Materialien	53
4.2	Präparation von Rattenleberzellkernen	53
4.3	Präparation von ^{3}H-Thymidin markierten Zellkernen	54
4.4	Nuklease-Verdauung von Zellkernen	54
4.4.1	Inkubation von Zellkernen mit Restriktionsnuklease Eco R I	54
4.4.2	Inkubation von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease	55
4.4.3	Nachspaltung von löslichem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und mit DNAase II	56
4.5	Lyse der Zellkerne	56

		Seite
4.6	Restriktionsnukleasen	57
4.6.1	Isolierung der Restriktionsnuklease Eco R I	57
4.6.2	Abtrennung des Triton X-100 von Eco R I über Hydroxyapatit	59
4.7	Isolierung von DNA	60
4.8	Spaltung von DNA mit Restriktions-nukleasen	61
4.9	Gelelektrophorese	62
4.9.1	Analytische Gelelektrophorese	62
4.9.2	Präparative Gelelektrophorese zur Isolierung von Restriktionsfragmenten	62
4.9.3	Bestimmung der Fragmentlängen	63
4.9.4	SDS-Polyacrylamidelektrophorese	64
4.10	Saccharosegradientenzentrifugation	65
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	66
6	ANHANG: ÜBERSICHT ÜBER NEUERE ERGEBNISSE	69
7	LITERATURVERZEICHNIS	72
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
	LEBENSLAUF	

1 EINLEITUNG

Die genaue Kenntnis der Struktur des Chromatins ist eine wesentliche Voraussetzung zu einem tieferen Verständnis jener Mechanismen, die der Kontrolle der Genexpression zugrunde liegen. Erkenntnisse über Struktur und Funktion des Chromatins haben sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Durch die Anwendung biochemischer und physikalischer Methoden konnte die fundamentale Struktur des Chromatins aufgeklärt werden (Übersichten 4, 5, 7, 17, 23, 27, 34, 45).

Wesentlich für die Struktur des Chromatins ist deren Aufbau aus identischen Untereinheiten, den Nukleosomen. Ein Nukleosom besteht aus einem Oktameren-Komplex von je 2 der 4 Histone H2A, H2B, H3 und H4, um die ein Segment von etwa 200 Nukleotidpaaren der kontinuierlichen DNA-Kette gewunden ist. Dabei unterscheidet man zwischen dem eigentlichen Nukleosomenkern, der aus dem Histon-Oktameren-Komplex und einem DNA-Segment von 146 Nukleotidpaaren besteht, und der 'Spacer'- bzw. 'Linker'-Region, die 2 benachbarte Nukleosomenkerne in der Chromatin-Fiber verbindet. Die genaue Lokalisation von Histon H1 ist noch nicht vollständig geklärt, doch es ist allgemein akzeptiert, daß Histon H1 mit der 'Spacer'-Region assoziiert ist.

Nach neueren Daten besitzt ein Nukleosomenkern die Form eines Zylinders, mit einem Durchmesser von etwa 110 Å und einer Höhe von etwa 55 Å. Die DNA ist auf der Außenseite dieses Zylinders in superhelikaler Anordnung lokalisiert (9,41).

Um die DNA in die extrem kompakte Form zu falten, wie sie im Zellkern gefunden wird, muß das Nukleosom an der Bildung höherer Strukturordnungen beteiligt sein. Ergebnisse, die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und Neutronenbeugung an isoliertem Chromatin gewonnen wurden, wiesen auf eine Struktur hin, bei der die Nukleosomenkette eine zylindrische Spule bildet, die einen Durchmesser von 250-300 Å, eine Ganghöhe von 100 Å und ein zentrales Loch von 100 Å besitzt (sog. Solenoid-Modell, 3,8). Diese Struktur entspricht einer 2. Stufe der Chromatinkondensation. Weiterhin führten genaue Analysen der Ergebnisse von Nuklease-Verdauungen an Zellkernen zu einem Modell, das für die höhere Organisation von Chromatin eine Domänenstruktur postuliert. Als Domäne wird dabei ein Chromatin-Strang in der Grössenordnung von ca. 40000 Nukleotidpaaren (entsprechend 200 Nukleosomen) definiert, dessen Enden entweder an eine spezifische Kernmatrix gebunden sind oder mit benachbarten Chromatinsträngen quervernetzt sind (25).

Ein wesentlicher Beitrag bei der Entwicklung dieser heutigen Vorstellung über die Struktur des Chromatins wurde durch die Anwendung von Nukleasen zur Verdauung von Chromatin im Zellkern geleistet. Die in diesen Experimenten verwendeten unspezifischen Nukleasen waren die Ca^{2+} - Mg^{2+}-abhängige endogene Nuklease aus Rattenleber (20), Mikrokokkus-Nuklease (37), DNAase I (38) und DNAase II (1,31). Darüber hinaus können auch Restriktionsnukleasen zum Abbau von Chromatin eingesetzt werden (21,46).

Ein wichtiger Aspekt, der den Experimenten zum Abbau von Chromatin mit Nukleasen zugrunde liegt, ist ihr Einsatz für die präparative Darstellung von löslichem Chromatin. Es ist wünschenswert, Chromatin von der komplexen Kern-

struktur abzutrennen und in gelöster Form darzustellen. Bei der klassischen Methode wird der dazu erforderliche begrenzte Abbau der DNA-Kette durch mechanisches Scheren erreicht (11). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß durch Scheren dargestelltes, lösliches Chromatin die native, nukleosomale Struktur weitgehend verloren hat (39).

Im Gegensatz dazu bleibt die nukleosomale Struktur bei der Darstellung von löslichem Chromatin durch begrenzten Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten (39). Bei dieser Methode wird die DNA-Kette im Chromatin durch kurzzeitiges Einwirken von Mikrokokkus-Nuklease gespalten und durch Lyse der Zellkerne lösliches Chromatin freigesetzt. Dabei entstehen unspezifische Chromatinfraktionen, deren Größe von den experimentelle Bedingungen abhängig ist. Will man jedoch spezifische Chromatinfraktionen erhalten, muß die DNA im Chromatinverband mit spezifischen Nukleasen gespalten werden, die in Form der Restriktionsnukleasen zur Verfügung stehen; diese benötigen zur Spaltung der DNA eine genau definierte Erkennungssequenz. Je nach Häufigkeit und Verteilung dieser Erkennungssequenz auf der DNA wird man bei Spaltung der DNA im Chromatinverband mit Restriktionsnukleasen definierte Chromatinfraktionen unterschiedlicher Größe erhalten.

Eukaryonten enthalten wesentlich mehr an genetischer Information als Prokaryonten. Nicht alle im Eukaryontengenom vorkommenden DNA-Sequenzen dienen jedoch der Transkription in RNA und der Translation in Protein. Vielmehr enthält die Eukaryonten - DNA große Mengen an repetitiven Basensequenzen, die man grob in zwei Klassen, nämlich mäßig repetitive und hochrepetitive DNA einteilen kann. Während die mäßig repetitiven Elemente vereinzelt im Genom verstreut

vorkommen, ist die hochrepetitive DNA (Satelliten-DNA) im allgemeinen auf die centromeren Regionen, in manchen Fällen auch auf die telomeren Regionen der Chromosomen beschränkt. Dort bilden sie das auch lichtmikroskopisch sichtbare Heterochromatin. Satelliten sind aus kurzen Einheiten aufgebaut, die tandemartig angeordnet sind. Die Bedeutung und die Funktion der Satelliten-DNA ist nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß die Satellitensequenzen an der Ausrichtung der Chromosomen in der Mitose und der Meiose beteiligt sind.

Enthält eine repetitive Sequenz die Spaltstelle einer Restriktionsnuklease, so besteht die Möglichkeit, diese Satelliten-DNA enthaltende Chromatinfraktion (Hetero-Chromatin) nach Spaltung mit dieser Restriktionsnuklease als lösliches Chromatin zu isolieren. Diese spezifische, eine definierte DNA-Sequenz enthaltende Chromatinfraktion würde die Untersuchung weiterer Fragen ermöglichen, z.B. über die nukleosomale Struktur, die Beziehung zwischen DNA-Sequenz und Nukleosomen, sowie über die Proteinzusammensetzung.

In dieser Arbeit sollte die Voraussetzung zur Beantwortung dieser Fragen geschaffen werden. Da über den Satelliten-DNA-Anteil des Ratten-Genoms bisher kaum Ergebnisse vorlagen, sollte zunächst die Satelliten-DNA der Ratte durch Abbau mit Restriktionsnukleasen charakterisiert werden. Es war die Aufgabe, mit Hilfe der Restriktionsnuklease Eco R I die präparative Darstellung von löslichem Chromatin zu untersuchen, die dabei entstehenden Chromatinfraktionen zu analysieren und die Satelliten-DNA enthaltende Chromatinfraktion (Heterochromatin) zu isolieren.

2 ERGEBNISSE

2.1 Spaltung von Ratten-DNA mit Restriktionsnukleasen

Hoch-repetitive Komponenten der Ratten-DNA wurden bereits in früheren Arbeiten dieses Laboratoriums beschrieben (21, 47). Diese repetitiven Anteile konnten jedoch nicht durch Zentrifugation im Dichtegradienten von der Hauptmenge der DNA abgetrennt werden. Diese Methode wird üblicherweise zur Abtrennung und Reinigung von Satelliten-DNA verwendet. Die Trennung erfolgt hierbei aufgrund der unterschiedlichen Dichten von Haupt- und Satelliten-DNA. Spaltungen von Ratten-DNA mit den Restriktionsnukleasen Eco R I, Hind II und Hind III dagegen zeigten nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente eine Reihe scharfer Banden (47). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Spaltung mit den Restriktionsnukleasen Bsu (21), Eco R II und Alu (W. Pfeiffer, unveröffentlicht) beobachtet. Von anderen Autoren wurden ebenfalls hoch-repetitive Komponenten der Ratten-DNA beschrieben (18, 42, 50).

Um über den Satelliten-Anteil genauere Daten zu erhalten, wurde Ratten-DNA mit den Restriktionsnukleasen Eco R I und Hind III gespalten und die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Untersuchung der Kinetik dieser Spaltungen und der Analyse der im zeitlichen Verlauf entstehenden DNA-Fragmente sollte eine Identifizierung und Zuordnung einzelner DNA-Fragmente zu repetitiven Sequenzen ermöglichen.

2.1.1 Isolierung von Ratten-DNA

Hochmolekulare DNA wurde im präparativen Maßstab aus Leberzellkernen isoliert. Dazu wurden die Zellkerne in Puffer A gewaschen und in niederionischem Puffer aufgenommen, wobei Lyse der Kerne eintrat. Zum Abbau der Kernproteine wurden die lysierten Kerne mit Proteinase K inkubiert, unter Zusatz von 0,4% SDS. Nach Phenolextraktion und Fällung mit Äthanol wurde die DNA in Trispuffer aufgenommen. Bei der Elektrophorese waren keine kleinen DNA-Bruchstücke zu erkennen, das durchschnittliche Molekulargewicht war größer als 40 Kb, was dem Auflösungsvermögen von Agarosegelen entspricht.

Zur weiteren Reinigung wurde bei einigen Präparationen die RNA mit Ribonuklease T_2 abgebaut und die DNA durch Äthanolfällung von den entstandenen Ribonukleotiden abgetrennt. Zum Ausschluß einer Desoxyribonukleaseaktivität von T_2 wurde λdv 1-Phagen-DNA (mit Bsu gespalten) mit T_2 inkubiert. Die Auftrennung im Agarose-Gel zeigte keinen Abbau der DNA-Fragmente, somit konnte eine DNAase-Aktivität von T_2 ausgeschlossen werden.

2.1.2 Kinetik der Spaltung mit Restriktionsnuklease Eco R I

Die zur Erkennung einer Spaltstelle notwendige Basensequenz ist im Falle von Eco R I folgende Hexanukleotidsequenz (19): $-^{5'}\text{GAATTC}^{3'}-$. Die Spaltung erfolgt in beiden DNA-Strängen zwischen den Basen G und A (Pfeil), dadurch werden als Spaltprodukte DNA-Fragmente mit kohäsi-

ven Enden, sog. 'sticky ends', gebildet. Die Voraussetzungen für eine maximale Eco R I-Aktivität sind hohe Ionenstärke (25-100 mM Tris, 50-120 mM NaCl), Magnesiumionen (3-10 mM $MgCl_2$) und pH um den Neutralpunkt (7-7,5) (49). Wird die Spaltung bei pH 8-9,5 und bei niedriger Ionenstärke (25 mM Tris-HCl, 2 mM $MgCl_2$) durchgeführt, so tritt die Eco R I*-Aktivität auf, die nur noch eine Tetranukleotidsequenz benötigt, welche der Sequenz der 4 inneren Basen der Hexanukleotidsequenz entspricht (49).

Die Kinetik der Spaltung von Ratten-DNA mit Eco R I zeigt Abb.1. Zum Vergleich mit den Chromatinspaltungen (Kap.2.3) wurde die DNA-Spaltung ebenfalls unter den Bedingungen der Chromatinspaltung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen traten keine Änderungen im DNA-Spaltungsmuster (Abb.1,L) im Vergleich zu Spaltung unter Eco R I-Standardbedingungen (Abb.2, A) auf, wenn die Spaltung jeweils bis zum gleichen Ausmaß durchgeführt wurde.

Die Reaktion mit Eco R I führt zur Bildung von vielen heterogenen DNA-Fragmenten unterschiedlicher Molekülgröße, die im Agarose-Gel als sog. Hintergrund-DNA in Erscheinung treten. Zusätzlich treten weitere DNA-Fragmente definierter Molekülgröße auf, die anhand der scharfen Banden im Gel identifizierbar sind (Abb. 1, L). Neben einer 95 Np Bande und solchen, die ganzzahlige Vielfache von 95 Np sind, können weitere Fragmente mit 440, 1450 und 2425 Np beobachtet werden. Letztere sind mäßig repetitiven Sequenzen zuzuordnen, während erstere Abbauprodukte des Satelliten darstellen. Bei kürzeren Inkubationszeiten wird die Satelliten-DNA nur teilweise gespalten. Man findet im Agarose-Gel eine Serie von Fragmenten, deren Molekülgrößen ganzzahlige Vielfache von 95 Np sind (Abb. 1 , E - I).

Abb.1: Kinetik der Spaltung von Ratten-DNA mit Eco R I

DNA wurde bei einer Konzentration von 4 A 260-Einheiten/ml in Puffer A, der 70 mM NaCl, 0,8 mM EDTA, 0,08 mM EGTA, 10 mM $MgCl_2$ und 0,05% Triton X-100 enthielt, mit Eco R I (40 U/ml) bei 37°C inkubiert. Aliquots wurden nach folgenden Zeiten entnommen und die Reaktion in 20 mM EDTA gestoppt: 0, 30, 45 Sek., 1, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,5 und 10 Min (Bahnen A-L). In Bahn (M) wurden als Referenz-DNA aufgetragen: $\overline{\lambda dv}$ 1 DNA (mit Bsu gespalten), λdv 1 DNA (mit Hind III gespalten) und λdv 21 DNA (mit Hind III gespalten). Die Gelelektrophorese erfolgte in 0,8% Agarose bei 4 V/cm für 3 Std.

Zur Beurteilung über das Ausmaß dieser Spaltung und der Frage nach dem Endmuster wurde die Reaktion mit höherer Eco R I-Konzentration und längerer Inkubationszeit durchgeführt (Abb.2, B). Zum Vergleich wurde in Abb.2, A DNA aus einer Spaltung mit 5-fach geringerer Eco R I-Konzentration aufgetragen. Bei der Spaltung mit hoher Eco R I-Konzentration treten weitere Fragmente auf. Zusätzlich ist eine Verschiebung der Intensitäten der Banden des 95 Np Registers auffallend. Die Intensitätszunahme des dimeren und insbesonders des monomeren Fragments (190 bzw. 95 Np) verbunden mit der gleichzeitigen Abnahme der Intensitäten der tetra- und pentameren Fragmente lassen erkennen, daß vorher nicht gespaltene Eco R I-Spaltstellen durch diese verstärkten Inkubationsbedingungen gespalten werden. Nach Verdoppelung der Inkubationszeit war keine weitere Veränderung dieses Spaltmusters zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, daß das Endmuster der Eco R I-Spaltung erreicht ist (Abb.2, B). Die neu aufgetretenen Banden besitzen Fragmentlängen von 120, 220, 350 und 405 Np, können jedoch aufgrund dieser Molekülgrößen in keine Beziehung zu den Fragmenten des 95 Np Registers gesetzt werden.

Die Fragmentlängen wurden sowohl durch Vergleich mit Referenz-DNA bekannter Größe bestimmt (Abb.1, M), als auch durch eine interne Eichung mit den Fragmenten des 95 Np Registers, nachdem deren Fragmentgrößen unabhängig als isolierte Banden bestimmt worden waren (Kap. 2.2.1). Die interne Eichung ist dabei der externen vorzuziehen, da, wie bereits gezeigt wurde (16), große Mengen an DNA in einer Bande die Wanderungsgeschwindigkeit der übrigen Banden während der Elektrophorese beeinflussen können. Dieser Effekt wird bei der internen Eichung ausgeglichen.

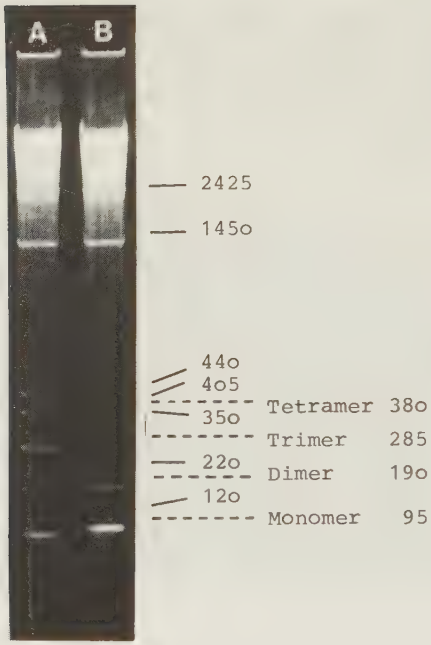

Abb.2: Endmuster der Spaltung von Ratten-DNA mit Eco R I

DNA wurde in 25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,4 bei einer Konzentration von 2 A 260-Einheiten/ml bei 37°C gespalten. Die Konzentration von Eco R I und die Inkubationszeit waren in (A) 20 U/ml, 2 Std. und in (B) 100 U/ml, 2 Std. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1,2% Agarose bei 4 V/cm für 3 Std. (Größenangaben in Nukleotidpaaren).

Durch die Untersuchung der Kinetik der Spaltung von Ratten-DNA mit Eco R I konnte somit die Existenz einer aus Untereinheiten bestehenden und tandemartig angeordneten Sequenz sichergestellt werden. Obwohl die Bezeichnung Satelliten-DNA strenggenommen nur für solche Gruppen von DNA gilt, die bei der Zentrifugation im Dichtegradienten getrennt von der Haupt-DNA sedimentieren, und dies für die Ratten-DNA nicht der Fall ist (18,50), soll die Bezeichnung Satelliten-DNA für diese mit Eco R I spaltbare, repetitive Komponente der Ratten-DNA dennoch beibehalten werden.

2.1.3 Kinetik der Spaltung mit Restriktionsnuklease Hind III

Für die Spaltung von DNA mit Hind III wurde ein Puffer von 0,06 M NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 7 mM Tris-HCl, pH 7,4 verwendet (51). Um auch hier identische Bedingungen zu den Chromatinspaltungen und zur DNA-Spaltung mit Eco R I herzustellen, wurde die Spaltung mit Hind III ebenfalls unter den Bedingungen der Chromatinspaltung durchgeführt. Der Vergleich dieser Spaltungsbedingungen zeigte jedoch keine Unterschiede im DNA-Muster bei der Gelelektrophorese.

Als Endprodukte der Spaltung von Ratten-DNA mit Hind III wurden bereits zwei Fragmente mit 150 und 390 Np beschrieben (47). Die Untersuchung der Kinetik dieser Spaltung zeigt jedoch, daß unter Partialspaltungsbedingungen eine Serie von Banden entsteht, deren Fragmentlängen sich jeweils um 380 Np unterscheiden (Abb.3, A). Bei sehr frühen Zeiten der Kinetik kann diese Bandenserie bis zum 12-fachen des Monomeren verfolgt werden. Diese multimeren DNA-Fragmente

werden im weiteren Verlauf der Kinetik zu den mono-, di- und trimeren Fragmenten mit Kettenlängen von 380, 760 und 1140 Np abgebaut (Abb. 3, B). Die Divergenz im Satelliten, die auf Punktmutationen zurückzuführen ist, verhindert den vollständigen Abbau zum monomeren Fragment.

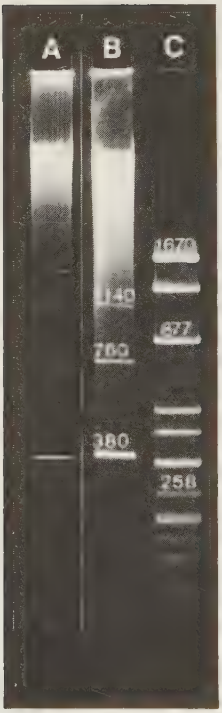

Abb.3: Spaltung von Ratten-DNA mit Hind III

DNA wurde bei einer Konzentration von 5 A 260-Einheiten/ml in Puffer A, der 6 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 0,02 mM EGTA und 5 mM β-Merkaptoäthanol (pH 7,4) enthielt, bei 37°C mit Hind III (125 U/ml) gespalten.
A: 40 Min (Partialspaltung)
B: 140 Min (Endmuster)
C: Referenz-DNA, λdvl, mit Bsu gespalten.
Die Gelelektrophorese erfolgte in 1% Agarose bei 4 V/cm für 3,5 Std. (Fragmentlängen in Nukleotidpaaren).

Zusätzlich erscheinen im Endmuster dieser Spaltung weitere Fragmente mit 180 und 3650 Np.

Die unter den Bedingungen der Partialspaltung gebildeten multimeren DNA-Fragmente lassen eine aus Untereinheiten aufgebaute und tandemartig angeordnete Struktur dieses Anteils der Ratten-DNA erkennen. Auffallend ist hierbei die Übereinstimmung der Molekülgrößen zwischen dem monomeren Hind III-Fragment (380 Np) und dem Tetrameren Eco R I-Fragment (380 Np).

Analog dazu verhalten sich das dimere Hind III-Fragment (760 Np) und das oktamere Eco R I-Fragment (760 Np), ebenso wie die Restriktionsfragmente mit höherer Multiplizität. Damit stellt sich die Frage, ob mit den hier eingesetzten Restriktionsenzymen jeweils differente Satelliten-DNAs mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung gespalten werden oder ob die Spaltstellen für beide Enzyme nur auf einer Satelliten-DNA lokalisiert sind.

2.2 Kartierung der Satelliten-DNA mit Eco R I und Hind III

Zur Klärung der Frage, ob mit beiden Enzymen der gleiche Satelliten-Anteil oder ob verschiedene Satelliten-DNAs gespalten werden, wurden Hind III bzw. Eco R I-Fragmente durch präparative Gelelektrophorese isoliert und nachgespalten. Die isolierten, oligomeren Satellitenfragmente, die noch ungespaltene Spaltstellen enthalten, können entweder mit dem gleichen Enzym zu Ende gespalten werden, was für eine Anordnung der Satelliteneinheiten in einfacher Tandem-Struktur spricht, oder der Spaltung mit dem anderen Restriktionsenzym unterzogen werden (Nachspaltung). Liegen die Spaltstellen für beide Enzyme auf derselben Satelliten-DNA, läßt sich aufgrund der bei der Nachspaltung zusätzlich auftretenden DNA-Fragmente die relative Position der beiden Spaltstellen bestimmen, d.h. eine physikalische Kartierung ist damit möglich.

Mit den isolierten Restriktionsfragmenten ist auch eine genaue Größenbestimmung möglich, die durch Zumischen zu DNA-Markern von bekannter Molekülgröße und Auftrennung des Gemisches im Agarosegel erreicht wird (interne Eichung).

2.2.1 Isolierung und Nachspaltung von Restriktionsfragmenten

Zur Isolierung von Satellitenbanden kamen verschiedene Methoden zur Anwendung, wobei sich eine nach Smith und Birnstiel (52) modifizierte Methode am günstigsten erwies. Dabei wurde die DNA im präparativen Maßstab in getrennten Ansätzen mit Eco R I und Hind III gespalten. Die Spaltungsbedingungen wurden so gewählt, daß der Satelliten-Anteil nur partiell gespalten wurde, um für die Isolierung der oligomeren Fragmente genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die einzelnen Banden aus dem Gel geschnitten und die Gelscheiben in ein neues Gel polymerisiert. Nach Erstarren des Gels wurde es mit DE 52 überschichtet, um die DNA, nach Elektrophorese mit umgekehrter Polarität, aufzunehmen. Nach Transfer dieser DE 52-Schicht auf eine DE 52-Säule konnten die isolierten DNA-Fragmente gereinigt und eluiert werden.

Mit dieser Methode wurden folgende Restriktionsfragmente isoliert: aus der Eco R I-Spaltung die tetra- bis undekameren Fragmente des 95 Np-Registers; aus der Hind III-Spaltung das mono- und dimere Fragment des 380 Np-Registers sowie die Banden mit 180 und 3650 Np.

Bei der Nachspaltung der Eco R I-Fragmente mit Eco R I wurden, wie erwartet, die mono- bis tetrameren Fragmente des 95 Np-Registers gebildet. Ein Beispiel dafür gibt Abb.4, welche die Nachspaltung des oktameren und des undekameren Fragments zeigt. Die Nachspaltungen der übrigen isolierten

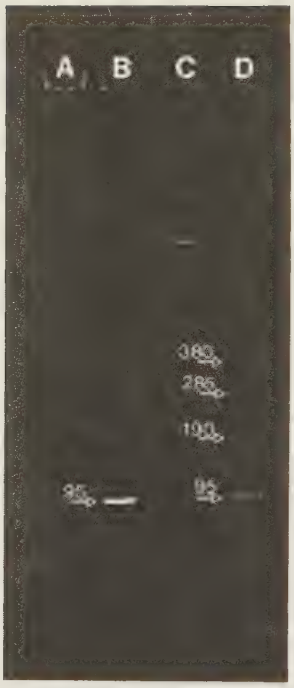

Abb.4: Nachspaltung isolierter Eco R I-Fragmente mit Eco R I

Etwa 0,05 A 260-Einheiten der isolierten Eco R I-Fragmente wurden in 20 µl Spaltpuffer (49) für 6,5 Std. bei 37°C mit Eco R I (20 U) gespalten.
A: Reelektrophorese und B: Nachspaltung des oktameren Eco R I-Fragments
C: Reelektrophorese und D: Nachspaltung des undekameren Eco RI-Fragments.
Die Gelelektrophorese erfolgte in 1,5% Agarose bei 4 V/cm für 3 Std.

Eco R I-Fragmente mit Eco R I ergaben identische Spaltungsmuster wie in Abb.4.

Die Nachspaltung der mono- und dimeren Hind III-Fragmente mit Eco R I weist nach, daß die Spaltstellen für beide Enzyme auf derselben Satelliten-DNA lokalisiert sind. Bei der Reaktion mit Eco R I entstehen die Fragmente des 95 Np-Registers sowie weitere Banden, deren Fragmentgrößen durch

durch die relative Position der beiden Spaltstellen zueinander bedingt sind (Abb.5, F, H). Die Isolierung und Anreicherung des 180 Np Hind III-Fragments zeigt bei der Reelektrophorese eine zusätzliche schwache Bande mit etwa 200 Np (Abb.5, I), die nach Spaltung der Gesamt-DNA mit Hind III im Gel nur andeutungsweise zu erkennen ist (Abb.5, B). Sowohl das 180 Np als auch das 200 Np Hind III-Fragment werden von Eco R I nicht gespalten (Abb.5, K). Das 3650 Np Hind III-Fragment (Abb.5, C) enthält eine Spaltstelle für Eco R I, die zur Bildung von 2 Fragmenten führt, deren Größen mit 2500 und 1070 Np bestimmt wurden (Abb.5, D). Diese Hind III-Fragmente (180, 200 und 3650 Np) sind demnach keine Abbauprodukte des Satelliten, sondern müssen mittelrepetitiven Sequenzen zugeordnet werden.

Zur vollständigen Spaltung der isolierten Restriktionsfragmente war bei allen Nachspaltungen eine erhöhte Aktivität an Restriktionsenzym notwendig. Der Grund hierfür liegt möglicherweise in Verunreinigungen, die bei der Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel angereichert wurden und die auch bei dem anschließenden Reinigungsschritt über eine DE 52-Säule nicht beseitigt werden konnten. Die Nachspaltung oligomerer Eco R I-Fragmente mit Hind III führte nur zu partieller Spaltung, da Hind III in nicht ausreichend hoher Konzentration zur Verfügung stand. Obwohl diese Spaltung unvollständig verlief, ließ sich die Bildung einer 380 Np-Bande sowie weiterer Zwischenbanden im Gel erkennen (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stimmt mit der Nachspaltung von isolierten Hind III-Fragmenten mit Eco R I überein und bestätigt damit die gemeinsame Lokalisation der Spaltstellen für beide Restriktionsenzyme auf dieser Satelliten-DNA.

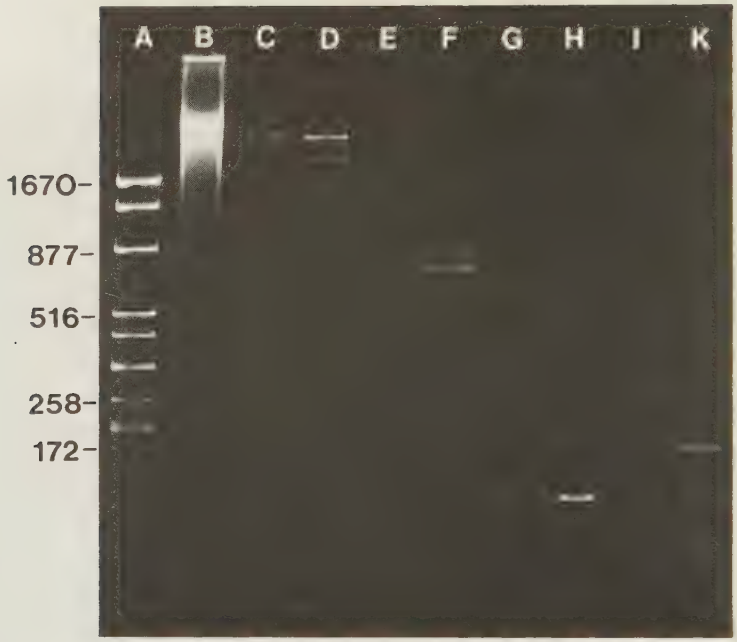

Abb.5: Nachspaltung von isolierten Hind III-Fragmenten mit Eco R I

Je 0,03 - 0,05 A 260-Einheiten der isolierten Hind III-Fragmente wurden in 20 µl Spaltpuffer (49) bei 37°C für 14 Std. mit Eco R I (20 U) gespalten. Die Gelbahnen C, E, G und I enthalten die Reelektrophorese, die Bahnen D, F, H und K die Nachspaltung der isolierten Hind III-Fragmente.

C, D: 3650 Np Hind III-Fragment; E, F: Dimeres (760 Np);

G, H: Monomeres (380 Np) Hind III-Fragment;

I, K: 180 Np Hind III-Fragment

Bahn B enthält die Spaltung der Gesamt-DNA mit Hind III; Bahn A enthält als Referenz-DNA λdvl-DNA (mit Hae III gespalten) und λdvl-DNA (mit Hind III gespalten).
Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abb.4.

2.2.2 Physikalische Karte der Satelliten-DNA

Physikalische Karten (Restriktionskarten), auf denen die Anzahl und der Abstand der Spaltstellen von Restriktionsnukleasen aufgetragen sind, geben über die strukturelle Zusammensetzung hoch-repetitiver DNA wichtige Aufschlüsse. Eine exakte Bestimmung der Repeatlängen konnte durch Koelektrophorese der isolierten Fragmente mit Maus-Satelliten-DNA (partiell gespalten mit Eco R II, Monomer 242 Np (22)), sowie mit α-Satelliten-DNA aus African Green Monkey Zellen (partiell gespalten mit Hind III, Monomer 172 Np (10)) erreicht werden. Das Eco R I-Monomer wurde zu 95 $\pm$ 1 Np (Standardabweichung), das Hind III-Monomer zu 380 $\pm$ 4 Np bestimmt. Eine Hind III-Spaltstelle ist dabei 57 bzw. 38 Np von den benachbarten Eco R I-Spaltstellen entfernt.

Eine Zusammenfassung dieser Daten zeigt die Physikalische Karte der Abb.6. Danach ist der Aufbau dieser Satelliten-Komponente des Ratten-Genoms gekennzeichnet durch eine tandemartige Struktur aus Einheiten von 95 Np Länge (Eco R I-Fragment), wobei jedes 4. Fragment eine Spaltstelle für Hind III trägt.

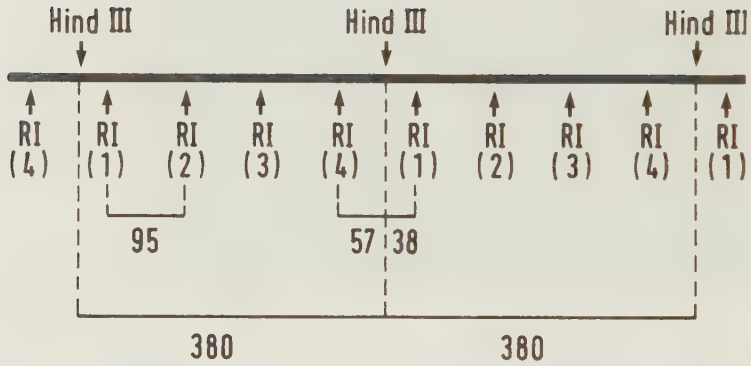

Abb.6: Physikalische Karte der Satelliten-DNA der Ratte

2.3 Präparation von löslichem Chromatin aus Rattenleberzellkernen mit Eco R I

Von Noll et al. (39) wurde eine Methode zur Darstellung von löslichem Chromatin entwickelt, bei der die 'native', nukleosomale Struktur des Chromatins erhalten bleibt. Einwirkungsdauer und Aktivität der eingesetzten unspezifischen Nuklease bestimmen dabei sowohl die Menge des freigesetzten löslichen Chromatins als auch die mittlere Größe der gebildeten Chromatinfragmente. Eine exakte Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Zusammensetzung der Chromatinfragmente scheint hierbei aufgrund der unspezifischen Spaltung durch die Nuklease eher unwahrscheinlich.

Restriktionsnukleasen lassen dagegen eine Reihe von Vorteilen erkennen. Da diese nur definierte Oligonukleotidsequenzen spalten, kann man von der Annahme ausgehen, daß nur eine begrenzte Zahl von DNA-Spaltstellen innerhalb des Chromatinverbandes existiert, so daß nach Spaltung des Chromatins mit einer Restriktionsnuklease und anschließender Fraktionierung lösliche Chromatinfragmente von definierter Zusammensetzung entstehen, deren Größenverteilung durch die Anzahl und Verteilung der Spaltstellen auf der DNA bedingt ist.

In Abhängigkeit von der Länge der Erkennungssequenz der Restriktionsnuklease und, verbunden damit, von der statistischen Häufigkeit dieser Sequenz werden unterschiedliche prozentuale Anteile an löslichem Chromatin freigesetzt. Mit Restriktionsnuklease Hae III, die eine Tetranukleotidsequenz (-GGCC-) zur Spaltung benötigt, werden etwa 90% des gesamten Chromatins freigesetzt (25), mit Eco R I

(Hexanukleotidsequenz, -GAATTC-) wird demnach ein geringerer Anteil zu erwarten sein, mit dem Vorteil, daß längere Fraktionen gewonnen werden können.

Ein wichtiger Punkt besteht in der Ausschaltung endogener Desoxyribonukleasen, deren ungehemmte, unspezifische Aktivität während der Inkubation der Zellkerne zu einer Erhöhung des löslichen Chromatinanteils führen würde, und zwar in unspezifischer Weise; mit der Anwendung von Spermin-Spermidin-Puffer bei der Präparation und Inkubation der Zellkerne wurde eine nahezu vollständige Unterdrückung dieser endogenen DNAase-Aktivität erreicht (21).

Ein weiterer Vorteil bei der Anwendung von Restriktionsnukleasen besteht darin, daß bereits freigesetztes Chromatin vor einem exonukleolytischen Abbau geschützt ist (bei entsprechender Suppression der im Zellkern vorhandenen endogenen DNAasen). Die Abspaltung einzelner Nukleotide an den freien DNA-Enden, die typischerweise bei Abbau von Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease auftritt (16), wird mit Restriktionsnukleasen nicht gefunden. Dies konnte durch Identifizierung der terminalen Nukleotide der DNA-Fragmente, die nach Abbau von Chromatin mit Bsu auftraten, nachgewiesen werden (21).

Um eine möglichst vollständige Spaltung aller der Nuklease zugänglichen Spaltstellen zu erreichen, ist eine hohe Enzymaktivität erforderlich, da die DNA im Zellkern einerseits eine hohe Konzentration aufweist und sie andererseits durch die Komplexierung mit den Histonen geschützt ist. Die in diesen Experimenten verwendete Enzympräparation von Eco R I hatte nach der Isolierung eine ausreichend hohe Aktivität von 750000 U/ml (siehe Methoden).

2.3.1 Schema der Solubilisierung und Fraktionierung von Chromatin

Eine Übersicht über die einzelnen Teilschritte der Solubilisierung von Chromatin gibt Abb.7. Rattenleberzellkerne wurden in Spermin-Spermidin-Puffer gewaschen und mit Eco R I inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Kerne nochmals in Inkubationspuffer gewaschen und abzentrifugiert. Die im Niederschlag vorliegenden Zellkerne wurden anschließend in niederionischem Puffer lysiert und das unlösliche Chromatin von der löslichen Chromatinfraktion durch Zentrifugation getrennt. Hierbei sollten die Bedingungen der Zellkernlyse genauer untersucht werden, mit dem Ziel, eine maximale Löslichkeit des freigesetzten Chromatins zu erreichen. Die Menge des in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Chromatins wurde über den DNA-Gehalt bestimmt, entweder durch Messung der Absorption bei 260 nm oder durch Bestimmung der Radioaktivität an ^{3}H-DNA. Die Markierung der DNA erfolgte durch intraperitoneale Injektion von ^{3}H-Thymidin an partiell hepatektomierten Ratten.

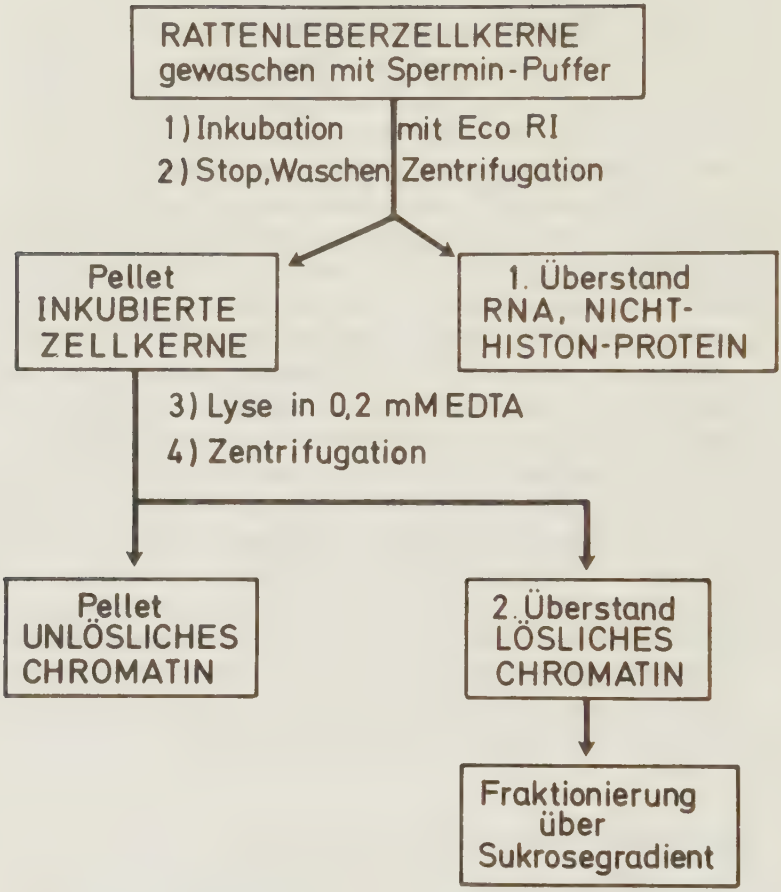

Abb.7: Schema der Solubilisierung und Fraktionierung von Chromatin

2.3.2 Freisetzung von löslichem Chromatin nach Inkubation der Zellkerne mit Eco R I

Nach dem in Abb.7 dargestellten allgemeinen Schema zur Präparation von löslichem Chromatin wurden verschiedene Parameter hinsichtlich ihres Einflusses auf die Menge des freigesetzten löslichen Chromatins untersucht. Ziel dabei war es, die Bedingungen der Freisetzung zu optimieren und den Einsatz dieser Methode zur Darstellung von löslichem Chromatin, speziell von Satelliten-Chromatin, im präparativen Maßstab zu ermöglichen.

Ursprünglich wurde bei diesen Experimenten zur Inkubation der Zellkerne ein Puffer mit 80 mM Salzkonzentration verwendet, entsprechend dem von Hewish und Burgoyne beschriebenen Puffer A (20). Diese Salzkonzentration wurde später auf 150 mM (Puffer B) erhöht (21), da in diesem Bereich Chromatin die geringste Löslichkeit besitzt (2,29). Unter diesen Bedingungen wurden im 1. Überstand nach Inkubation mit Eco R I und nachfolgender Zentrifugation der Zellkerne (Abb.7) nur etwa 2% des Chromatins gefunden, zusammen mit Nicht-Histon-Proteinen und RNA; ca. 98% des Gesamtchromatins verblieben nach diesem Präparationsschritt unlöslich im Zellkern. Damit ist gezeigt, daß während der Inkubationsphase kein Verlust an Chromatin auftritt und die eingesetzte Chromatinmenge vor dem eigentlichen Solubilisierungsschritt nahezu vollständig in den Zellkernen im Niederschlag vorhanden ist.

In Tab.1 sind verschiedene Präparationsbedingungen und die Mengen der freigesetzten Chromatinanteile dargestellt.

Die Inkubation der Kerne mit Eco R I wurde bei 37°C für 3 - 5 Std. durchgeführt, die darauf folgenden Extraktionszeiten nach Solubilisierung der Kerne variierten von 1 - 12 Std., wobei sich allerdings eine Lysisdauer von 4 - 5 Std. als völlig ausreichend erwies, um lösliches Chromatin vollständig zu extrahieren. Als wichtiger Faktor für die Menge des freigesetzten Chromatins erwies sich der pH-Wert des Lysispuffers. Bei Inkubation in Puffer B und Lyse der Kerne bei pH 7,5 wurden bis zu 10% des Chromatins freigesetzt (Tab.1, Nr.1). Eine Steigerung konnte durch Erhöhung des pH-Wertes von pH 7,5 auf pH 8,0 erzielt werden (Tab.1, Nr.2, 3). Unter diesen Bedingungen werden nahezu 40% des Gesamtchromatins freigesetzt.

Im Vergleich zu Puffer B wurden die Kerne auch in einem Puffer inkubiert, der zur Spaltung von DNA mit Eco R I verwendet wird. Dabei stieg der Anteil des löslichen Chromatins auf 55 - 64% (Tab.1 Nr.4). Dies ist jedoch auf die Mitwirkung endogener Nukleaseaktivitäten zurückzuführen, da im Kontrollexperiment ohne Eco R I unter diesen Inkubationsbedingungen bereits 28% des Chromatins freigesetzt wurden und die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus dem Kontrollexperiment ein schwaches nukleosomales Muster aufwies, analog dem DNA-Muster, wie es nach Spaltung von Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease gefunden wird (16, 37). Enthielt dieser DNA-Spaltpuffer zusätzlich die Polykationen Spermin und Spermidin, so reduzierte sich der Anteil des löslichen Chromatins nach Inkubation mit Eco R I auf 33% (Tab.1, Nr.5).

Nr.	Inkubationspuffer	Eco R I Konz. (U/ml)	Lysispuffer	Lysisdauer (Std.)	lösliches Chromatin (%)
1	Puffer B	15000 - 30000	0,2 mM EDTA pH 7,5	1 - 5	3,5 - 10
2	Puffer B	30000	0,2 mM EDTA pH 8,0	4	29 - 32
3	Puffer B	75000	0,2 mM EDTA pH 8,0	4	34 - 38
4	DNA-Spaltpuffer[1]	30000	0,2 mM EDTA pH 8,0	12	55 - 64
5	DNA-Spaltpuffer[1] Spermin-Spermidin	30000	0,2 mM EDTA pH 8,0	4,5	33
6	Puffer B	2500 Eco R I Triton frei	0,2 mM EDTA pH 8,0	5	30

1): 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ß-Merkaptoäthanol, pH 7,4

Tab.1: Freisetzung von löslichem Chromatin unter verschiedenen Präparationsbedingungen

Eine besondere Bedeutung für die Solubilisierung ist dem Vorgang der Lyse selbst beizumessen. Nach Inkubation mit Eco R I werden die Kerne gewaschen und anschließend in niederionischem Puffer aufgenommen, wobei sie schwellen. Der Lysispuffer muß hierbei sehr rasch zu den pelletierten Kernen gegeben werden, um eine vollständige Auflösung zu erreichen, da sonst ein Verklumpen der Kerne eintreten kann. Welchen Einfluß hier andere Parameter, wie z.B. die Oberfläche des Kernpellets, auf die Lyse haben, wurde nicht näher untersucht.

Die bisher dargelegten Ergebnisse zeigen den Zusammenhang zwischen verschiedenen Inkubations- und Lysebedingungen und dem freigesetzten löslichen Chromatinanteil. Bei Inkubation in Puffer B und Lyse der Kerne bei pH 8,0 werden 34 - 38% Chromatin freigesetzt. Untersucht man den kinetischen Verlauf dieser Reaktion (Abb.8), so wird deutlich, daß bereits nach 90 Min das Maximum der Solubilisierung erreicht ist. Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 5 Std. führt zu keiner weiteren Erhöhung der löslichen Chromatinfraktion, wie der Vergleich mit den Ergebnissen aus Tab.1 zeigt, bei denen die Inkubationszeiten 3 - 5 Std. betrugen. Unter Kontrollbedingungen, entweder ohne Nuklease oder mit Nuklease, aber ohne Mg^{2+}-Ionen, wurde praktisch kein Chromatin freigesetzt.

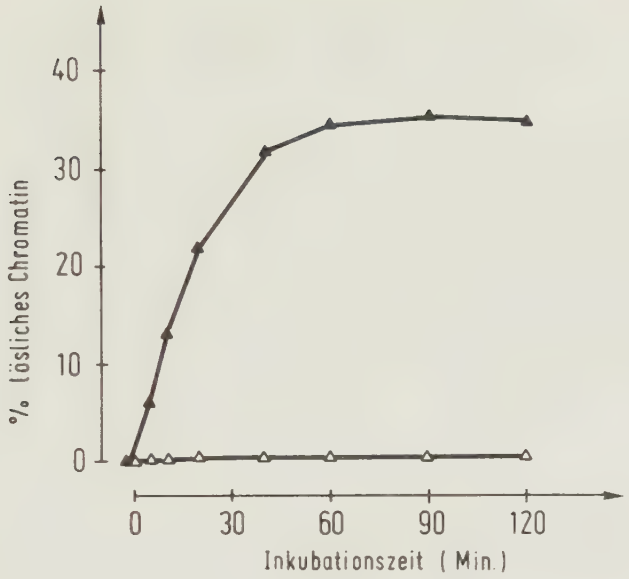

Abb.8: Freisetzung von löslichem Chromatin mit Eco R I

Rattenleberzellkerne wurden in Puffer B bei 37°C mit Eco R I (35000 Units) inkubiert (-▲-). Kontrollen wurden entweder ohne Eco R I oder mit der gleichen Menge Nuklease, aber ohne Mg^{2+}Ionen durchgeführt (-△-). Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots der Kernsuspension entnommen und in niederionischem Puffer lysiert (pH 8,0). Die Menge an löslichem Chromatin wurde durch Messung der Aktivität der mit ^{3}H-Thymidin markierten DNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

2.3.3 Einfluß von Triton X-100 auf die Verdauung von Zellkernen mit Eco R I und mit Mikrokokkus-Nukleasen

Da in allen Inkubationsansätzen mit Eco R I Triton X-100, das dem Puffer zur Lagerung von Eco R I zugesetzt wurde, vorhanden war (bis zu 0,02%), sollte ein möglicher Einfluß dieses nichtionischen Detergens auf die Freisetzung von löslichem Chromatin untersucht werden. Dazu wurde sowohl Triton-freies Eco R I zur Solubilisierung von Chromatin verwendet als auch der Abbau von Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease unter verschiedenen Triton X-100-Konzentrationen untersucht.

Zur Abtrennung von Triton X-100 wurde Eco R I über eine Hydroxyapatitsäule chromatographisch gereinigt. Nach Inkubation der Kerne mit diesem gereinigten Enzym in Puffer B wurden 30% lösliches Chromatin freigesetzt (Tab.1, Nr.6). Die Menge an löslichem Chromatin liegt somit im gleichen Bereich wie unter vergleichbaren Bedingungen mit Triton X-100 (Tab.1, Nr.2, 3), die geringere Ausbeute kann in der verminderten Aktivität von Eco R I liegen, die nach dem Reinigungsschritt nur noch 1/30 der ursprünglichen Aktivität betrug. Das Spaltmuster der DNA aus dem Gesamtchromatin und aus der löslichen Chromatin-Fraktion nach Auftrennung im Agarose-Gel zeigte keine Veränderungen im Vergleich zum DNA-Spaltmuster, das nach Inkubation mit Eco R I bei Anwesenheit von Triton X-100 erhalten wurde (Kap. 2.3.4). Ein Einfluß von Triton X-100 während der Inkubationszeit auf die Solubilisierung von Chromatin ist demnach nicht festzustellen.

Zur Unterstützung dieses Ergebnisses wurde auch der Abbau von Chromatin im Zellkern mit Mikrokokkus-Nuklease untersucht. Zellkerne wurden mit unterschiedlichen Mengen Triton X-100 (0; 0,001; 0,01; 0,1% v/v) inkubiert und die Kinetik der Verdauung nach 1 und 5 Min verfolgt (Abb.9). Mögliche Effekte von Triton X-100 könnten darin liegen, daß einerseits Histon H1 bzw. an den internukleosomalen Bereich gebundene Nicht-Histon-Proteine abdissoziieren und damit die Zugänglichkeit für die Mikrokokkus-Nuklease zur 'Linker-Region' erhöhen, andererseits die Histon-DNA-Wechselwirkungen aufgehoben oder vermindert werden und dadurch die Histon-Oktamere entlang der DNA-Kette gleiten können. Dies würde zur Folge haben, daß entweder Core-Partikel mit größerer Geschwindigkeit entstehen oder daß durch das Gleiten der Nukleosomen der regelmäßige nukleosomale Abstand verändert ist und damit mehr DNA entsteht, deren Fragmentlängen nicht denen der nukleosomalen Banden entsprechen (sog. Hintergrund-DNA). Keiner dieser Effekte ist bei der Inkubation mit Triton X-100 festzustellen. Mit Triton (Abb.9, A - I) erhält man das gleiche DNA-Spaltmuster wie ohne Triton (Abb.9, K, L, M).

Ein meßbarer Einfluß von Triton X-100 auf die Verdauung von Chromatin mit Eco R I oder mit Mikrokokkus-Nuklease ist demnach nicht nachweisbar.

Abb.9: Verdauung von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease bei verschiedenen Triton X-100 Konzentrationen

Rattenleberzellkerne (10 A 260-Einheiten/ml) wurden in Puffer B, der 2 mM Ca^{2+} und Triton X-100 (0,1; 0,01; 0,001 und 0%, v/v) enthielt, für 30 Min bei 37°C ohne Nuklease vorinkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von Mikrokokkus-Nuklease (Endkonz. 100 U/ml). Aliquots wurden entnommen zum Zeitpunkt 0 (vor Zugabe der Nuklease), nach 1 und 5 Min und die Reaktion mit 20 mM EDTA bei 0°C gestoppt. Die DNA wurde deproteinisiert und auf 1,5% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

A, B, C: 0,1% Triton X-100, 0, 1 und 5 Min;
D, E, F: 0,01% " , 0, 1 und 5 Min;
G, H, I: 0,001% " , 0, 1 und 5 Min;
K, L, M: ohne " , 0, 1 und 5 Min;
(Größenangabe in Nukleotidpaaren)

2.3.4 Analyse und Vergleich der DNA in den verschiedenen Chromatinfraktionen

Die Charakterisierung der Satelliten-DNA der Ratte wurde bereits in Kap. 2.2 dargelegt. Es konnte gezeigt werden, daß die repetitiven Einheiten dieser Satelliten-DNA in einem einfachen Tandem-Repeat angeordnet sind und daß die kürzeste Einheit, definiert durch die Spaltstellen von Eco R I, eine Fragmentlänge von 95 Np besitzt. Erfolgt die Spaltung der DNA mit der Restriktionsnuklease jedoch innerhalb der Chromatinstruktur, so ist zu erwarten, daß neben einer großen Anzahl von heterogenen Chromatinfragmenten auch solche Chromatinfragmente freigesetzt werden, die Sequenzen der Satelliten-DNA enthalten (= Heterochormatin).

Hinweise darauf erhielt man nach Spaltung von Rattenleberzellkernen mit Bsu und von Mäuseleberzellkernen mit Eco R II (21). In beiden Systemen zeigte die Elektrophorese der DNA ein nukleosomales Muster; innerhalb der nukleosomalen DNA-Banden wurden scharfe Banden gefunden, die Fragmenten der Satelliten-DNA entsprachen. Diese Befunde wiesen darauf hin, daß repetitive DNA-Komponenten ebenso wie die Haupt-DNA eine nukleosomale Struktur besitzen. Eine Spaltung durch die Restriktionsnuklease kann offenbar nur dann erfolgen, wenn Interferenz zwischen der Periodizität der Satelliten-DNA und der nukleosomalen Linker-Region auftritt.

In unserem Fall, d.h. im System Ratten-Chromatin und Eco R I, bietet sich ein verändertes Bild. Zellkerne wurden zusammen mit Eco R I inkubiert, das Chromatin durch Lyse der Kerne in lösliches und unlösliches Chromatin fraktioniert (s. Kap. 2.3.2) und DNA sowohl aus dem unfraktionierten Chromatin als auch aus der löslichen und unlöslichen Fraktion isoliert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in

0,8% Agarose (Abb.10). Im Vergleich zur Spaltung von Chromatin mit Bsu (21) tritt kein nukleosomales Muster auf, sondern es findet sich eine Serie von scharfen Banden, deren Fragmentlängen jeweils um 95 Np differieren; die am schnellsten wandernden DNA-Banden besitzen eine Fragmentlänge von 380 Np und entsprechen damit dem Tetrameren des Eco R I-Fragments von 95 Np. Dieses Muster zeigt Ähnlichkeit mit dem DNA-Muster, wie es bei Partialspaltung von proteinfreier DNA mit Eco R I auftritt (vgl. Abb.1), allerdings sind deutliche Unterschiede feststellbar (s.u.).

Vergleicht man die isolierte DNA aus unfraktioniertem Chromatin (Abb.10, B) mit der DNA aus der löslichen Chromatin-Fraktion (Abb.10, C), so wird deutlich, daß Satelliten-DNA enthaltendes Chromatin (Satelliten-Chromatin) in der löslichen Fraktion angereichert ist. Gleiche Mengen an DNA (10 µg) wurden jeweils auf das Gel aufgetragen. Es findet also eine präferentielle Freisetzung von Satelliten-Chromatin statt. Die Solubilisierung des Satelliten-Chromatins ist allerdings nicht vollständig; Satelliten-Banden mit geringerer Intensität werden auch in der unlöslichen Chromatin-Fraktion gefunden (Abb.10, D).

Abb.10: Präferentielle Freisetzung von Satelliten-Chromatin mit Eco R I

Rattenleberzellkerne wurden bei einer Konzentration von 120 A 260-Einheiten/ml in Puffer B für 3 Std. bei 37°C mit Eco R I (30000 U/ml) inkubiert. Zur Fraktionierung des Chromatins wurden nach Beendigung der Reaktion die Kerne in 0,2 mM EDTA, pH 8,0 für 3 Std. bei 4°C lysiert. Unlösliches Chromatin wurde durch Zentrifugation bei 10000 x g für 15 Min abgetrennt.
DNA wurde isoliert aus Gesamt-Chromatin (B), aus löslichem (C) und unlöslichem Chromatin (D). 10 µg DNA wurden pro Bahn aufgetragen. Als Referenz-DNA wurde in (A) Maus-Satelliten-DNA, die partiell mit Eco R II gespalten war, aufgetragen. Die Nummern geben Multiple des 242 Np-Fragments an. Die Elektrophorese erfolgte in 0,8% Agarose bei 4 V/cm für 3 Std.

Abb.11: Nachspaltung von DNA der löslichen Chromatin-Fraktion mit Eco R I

0,2 A 260-Einheiten DNA aus der löslichen Chromatin-Fraktion wurden in 100 µl Puffer B, der 10 mM $MgCl_2$ enthielt, mit 15 U Eco R I für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Nach Isolierung der DNA erfolgte die Auftrennung in 1,5% Agarose.

A: DNA aus der löslichen Chromatin-Fraktion
B: Gleiches Material wie A, mit Eco R I nachgespalten

Die Zahlen geben die Fragmentlängen in Nukleotidpaaren an.

Um das Ausmaß der Anreicherung von Satelliten-DNA in der löslichen Chromatin-Fraktion zu bestimmen, wurde die isolierte DNA der einzelnen Fraktionen mit Eco R I vollständig nachgespalten. Abb.11 zeigt als Beispiel die Nachspaltung der DNA aus der löslichen Chromatin-Fraktion. Dabei erhält man wieder das Muster, wie es nach Spaltung von proteinfreier Gesamt-DNA mit Eco R I auftritt (Abb.2). Unterschiede treten jedoch in der Intensität der Satelliten-Banden auf. Die Negative der Gele wurden densitometrisch ausgewertet und der Anteil der Peakflächen der Satelliten-Banden an der jeweiligen Gesamtfläche des Densitogramms bestimmt. In unfraktioniertem Chroma-

tin beträgt der Satelliten-Anteil 7%, in der löslichen Chromatin-Fraktion 14% und in der unlöslichen 5,6%. Der Anteil an Satelliten-Chromatin ist danach in der löslichen Chromatin-Fraktion doppelt so hoch wie in unfraktioniertem Chromatin.

Das DNA-Verteilungsmuster, das man bei der Elektrophorese der DNA aus der löslichen Chromatin-Fraktion erhält, hat bestimmte charakteristische Merkmale (Abb. 10, C und 11, A). Die mono-, di- und trimeren Fragmente (95, 190, 285 Np) der Eco R I-Einheit traten auch bei Langzeitinkubation der Zellkerne mit Eco R I nicht auf; es sei allerdings bemerkt, daß das dimere Fragment mit 190 Np bei manchen Spaltungen zusätzlich auftrat, wenn auch nur in sehr geringer Menge. Die Multimeren höheren Grades lassen ein reguläres Muster hinsichtlich ihrer quantitativen Verteilung erkennen. So sind die Intensitäten der Multimeren Nr. 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17 usw. jeweils verstärkt, dagegen die von Nr. 5, 6, 10, 14, 18 usw. schwächer angefärbt.

Eine einfache Interpretation dieser Ergebnisse ist nicht möglich. Eine exakte Aussage über die strukturelle Organisation von Heterochormatin läßt sich allein aufgrund des vorliegenden Chromatin-Spaltungsmusters der Satelliten-DNA nicht machen. Setzt man voraus, daß Heterochromatin ebenfalls wie das gut untersuchte Gesamt-Chromatin (4, 5, 27, 34) aus Nukleosomen (mit einer Repeat-Länge von ca. 200 Np) aufgebaut ist, so ist es überraschend, daß solche Abbauprodukte der Satelliten-DNA gebildet werden, deren Fragment-Größen nicht dem nukleosomalen 200 Np-Raster zuzuordnen sind (z.B. Fragmente mit 475, 665, 855 Np). Ob die Bildung dieser Fragmente auf eine Spaltung der Satelliten-DNA im intranukleosomalen Bereich zurückzuführen ist, wie von Lipchitz

und Axel postuliert wurde (30), läßt sich nicht entscheiden. Aus diesen Untersuchungen kann jedenfalls nicht ausgeschlossen werden, ob diese Ergebnisse besondere Eigenschaften der Eco R I-Spaltung reflektieren; wahrscheinlich sind diese Daten jedoch Ausdruck der Struktur des Chromatins dieser Fraktion.

2.3.5 Proteinverteilung nach Fraktionierung von Chromatin

Die Integrität der Histone beim Abbau von Chromatin mit Nukleasen gilt als wichtiger Parameter für die Intaktheit der nukleosomalen Struktur von Chromatinpräparationen. Histonanalysen von unfraktioniertem Chromatin nach Verdauung von Rattenleberzellkernen mit Bsu konnten diese Integrität bestätigen (21).

Zur Untersuchung der Proteine nach Fraktionierung von Chromatin wurden Zellkerne mit Eco R I inkubiert und die Proteine aus dem unfraktionierten Chromatin, aus dem 1. Überstand und aus der löslichen Chromatin-Fraktion im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 12). Im 1. Überstand (Bahn B) findet man eine Vielzahl von Nicht-Histon-Proteinen, jedoch keine Histone. Dies bedeutet, da ja der 1. Überstand dem Inkubationspuffer entspricht, wobei die Kerne noch nicht lysiert sind (Abb.7), daß während der Inkubation eine Diffusion von Nicht-Histon-Proteinen aus dem Zellkern stattfindet. Diese Diffusion scheint nicht mit dem zunehmenden Abbau des Chromatins zu korrelieren, da auch im Kontrollexperiment ohne Eco R I Nicht-Histon-Proteine im 1. Überstand gefunden werden (nicht gezeigt).

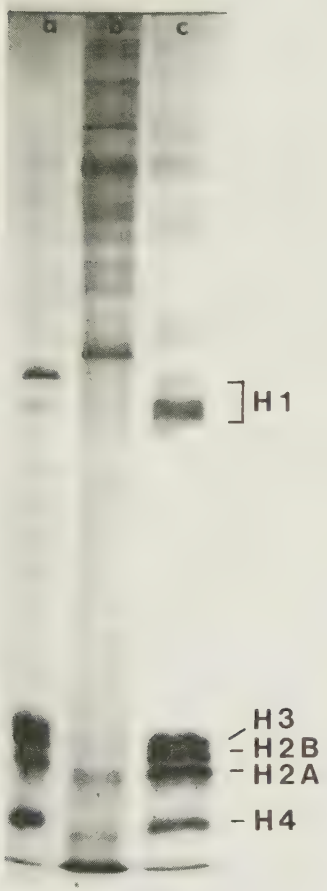

Abb.12: Proteinverteilung nach Fraktionierung von Chromatin

Zellkerne wurden bei einer Konzentration von 150 A 260 Einheiten/ml mit Eco R I (15000 U/ml) für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 20fachen Vol. von Puffer B, der 5 mM EDTA, 0,2 mM EGTA und 0,2% Triton X-100 enthielt, gestoppt und ein Aliquot für die Gesamtproteine (A) entnommen. Die Kerne wurden in dem gleichen Puffer, jedoch ohne Triton X-100, gewaschen und die Überstände für die Proteine des 1. Überstandes vereinigt (B). Lösliches Chromatin (C) wurde durch Lyse der Kerne in 0,2 mM EDTA, pH 8,0 für 3 Std. bei 4°C extrahiert.

A: Unfraktioniertes Chromatin, ca. 0,5 A 260 Einheiten der inkubierten Zellkerne wurden direkt in 50 µl Lämmli-Puffer aufgenommen.

B: Proteine aus dem 1. Überstand (ca. 0,5 A 260 Einheiten) wurden mit 20% TCA (Endkonz.) für 30 Min bei 4°C gefällt und nach Zentrifugation in 20 µl Tris-Base und 50 µl Lämmli-Puffer aufgenommen.

C: Ca. 0,7 A 260 Einheiten lösliches Chromatin wurden ebenfalls mit 20% TCA gefällt und in 20 µl Tris-Base, 50 µl Lämmli-Puffer aufgenommen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 3 Min bei 100°C gekocht. Die Auftrennung erfolgte in einem SDS-haltigen 11% Polyacrylamid-Plattengel für 7 Std. Die Spannung betrug während der Konzentrierung im Sammelgel 50 V, im Trenngel 100 V (3 Std.) und wurde danach auf 220 V erhöht.

Lösliches Chromatin (Abb.12, Bahn C) enthält ebenso wie Gesamtchromatin (Zellkerne mit Eco R I inkubiert, aber nicht fraktioniert, Bahn A) alle 5 Histone. Die Integrität der Histone bleibt während des Solubilisierungsschrittes erhalten. Histon H1, das am Aufbau des Nukleosomenkerns nicht beteiligt ist, wird neben den 4 Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 ebenfalls in der löslichen Chromatin-Fraktion gefunden, allerdings ist ein geringer Abbau von Histon H1 festzustellen. Eine Abspaltung von H1 aus dem Nukleosomenverband scheint aber keine notwendige Voraussetzung für die Solubilisierung von Chromatin zu sein.

2.4 Anreicherung und Reinigung von Satelliten-Chromatin durch Saccharosegradientenzentrifugation

Die Anreicherung des Satelliten-Chromatins in der löslichen Fraktion nach Eco R I-Verdauung der Zellkerne eröffnet die Möglichkeit einer weiteren Reinigung und Isolierung dieser heterochromatischen Chromatin-Fraktion. Die zu erwartenden Größenunterschiede zwischen dem Satelliten-Chromatin und dem Haupt-DNA-Chromatin sollten eine direkte Auftrennung nach Partikelgröße bei Zentrifugation im Saccharosegradienten erlauben.

Es wurde das Verhalten zweier löslicher Chromatin-Fraktionen untersucht, die bei unterschiedlichen Lysebedingungen solubilisiert wurden. Erfolgte die Extraktion von Chromatin nach Eco R I-Verdauung der Zellkerne bei pH 7,5 (Bedingungen, die zur Freisetzung von nur ca. 5% an löslichem Chromatin führten), so war vor der Auftrennung im Saccharosegradienten eine Konzentrierung des löslichen Chromatins notwendig. Dazu wurde die lösliche Chromatin-Fraktion für 16 Std. bei 40000 Upm zentrifugiert. Das gelartige Chromatinsediment konnte zwar im Saccharosegradienten aufgetrennt werden, die Ausbeute nach Fraktionierung der einzelnen Gradienten war jedoch zu gering.

Bessere Ergebnisse bezüglich der quantitativen Ausbeute erhielt man, wenn eine lösliche Chromatin-Fraktion verwendet wurde, die durch Extraktion der Zellkerne bei pH 8,0, nach Spaltung mit Eco R I, dargestellt wurde, wobei der lösliche Chromatinanteil ca. 30% betrug. Diese Chromatin-Fraktion

konnte direkt auf den Saccharosegradienten aufgetragen werden. Ein Konzentrierungsschritt war nicht notwendig. Das Sedimentationsprofil des unter diesen Bedingungen präparierten Chromatins zeigt Abb.13, A. Die Analyse der DNA aus den Gradientenfraktionen zeigt eine deutliche Abtrennung der Satelliten-DNA von der übrigen, hochmolekularen DNA (Abb.13, B). Die am langsamsten sedimentierende Chromatin-Fraktion (Fraktion 4) enthält fast ausschließlich Satelliten-DNA. Die densitometrische Auswertung ergab einen Reinheitsgrad von ca. 90% Satelliten-DNA.

Mit Hilfe der Eco R I-Spaltung und Auftrennung der löslichen Chromatin-Fraktion im Saccharosegradienten ist somit ein Weg gezeigt, Heterochromatin-Fraktionen von der Hauptmenge des gelösten Chromatins abzutrennen und mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren.

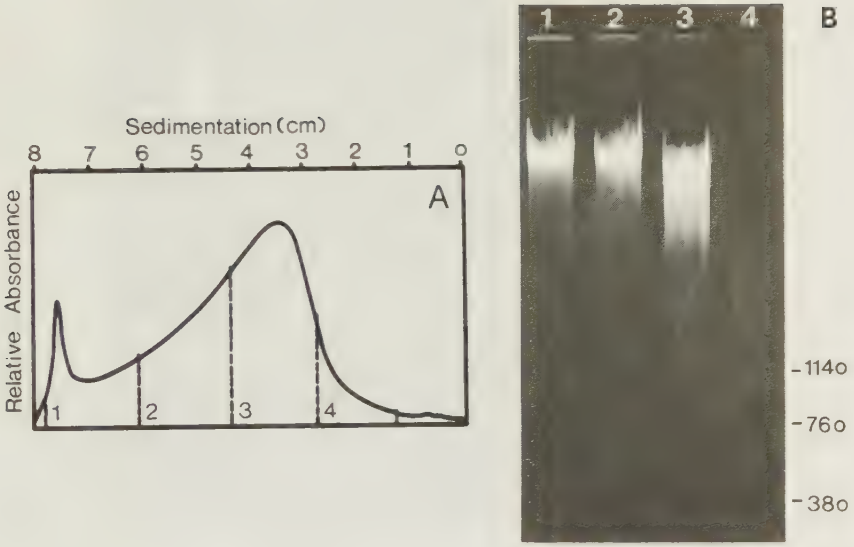

Abb.13: Saccharosegradientenzentrifugation von löslichem Chromatin

Rattenleberzellkerne wurden bei einer Konzentration von 200 A 260-Einheiten/ml für 2 Std. bei 37°C mit Eco R I (30000 U/ml) inkubiert und lösliches Chromatin durch Lyse der Zellkerne in 0,2 mM EDTA, pH 8,0 extrahiert (3 Std., 4°C). Je 3 A 260-Einheiten lösliches Chromatin wurden auf 5-20% Saccharosegradienten aufgetragen und in einem SW 41 Rotor bei 4°C für 4 Std. bei 40000 Upm zentrifugiert (Beckmann Spinco Ultrazentrifuge). Nach Fraktionierung des Gradienten wurden gleiche Fraktionen aus 4 Gradienten vereinigt und die DNA deproteinisiert.

A: Sedimentationsprofil von löslichem Chromatin. Der Gradient wurde in 4 Fraktionen unterteilt.

B: Auftrennung der isolierten DNA aus den Fraktionen 1-4 in 0,8% Agarose (Elektrophoresebedingungen wie in Abb.10; Grössenangaben in Nukleotidpaaren).

2.5 Nachspaltung von löslichem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und mit DNAase II

Kenntnisse über die heute gut untersuchte, nukleosomale Elementarstruktur des Chromatins beruhen zu einem großen Teil auf Verdauungsexperimenten von Chromatin mit unspezifischen Nukleasen und der genauen Analyse der DNA-Spaltprodukte (Übersichten 4, 5, 7, 17, 27, 34, 45 sowie 20, 37, 38). Bei der klassischen Methode zur Darstellung von löslichem Chromatin, bei der die Solubilisierung durch mechanisches Scheren erreicht wird (11), wird die nukleosomale Grundstruktur durch die einwirkenden Scherkräfte weitgehend zerstört. Untersuchungen von Noll et al. zeigten, daß geschertes Chromatin, das nach dem Scheren mit Mikrokokkus-Nuklease nachgespalten wurde, das typische, nukleosomale Muster verloren hat (39). Das Scheren verursacht offenbar eine Aufdehnung der Chromatin-Fiber, was zur Folge hat, daß einerseits kovalente Bindungen der DNA aufgebrochen werden und andererseits die DNA teilweise oder vollständig vom Histonkern abgelöst wird.

Im Gegensatz dazu bleibt die 'native', nukleosomale Struktur von löslichem Chromatin, das durch Verdauung von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease und anschließender Extraktion des löslichen Chromatins dargestellt wurde, erhalten (39). Diese Methode, die von den Autoren als 'Mikrokokkus-Test' bezeichnet wurde, sollte zur Prüfung der strukturellen Integrität des mit Eco R I dargestellten löslichen Chromatins verwendet werden. Dazu wurde lösliches Chromatin mit Eco R I präpariert und die Kinetik der Nachspaltung mit Mikrokokkus-Nuklease verfolgt (Abb.14).

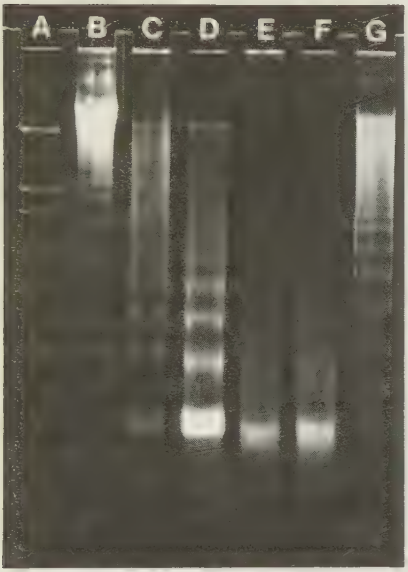

Abb.14: Nachspaltung von löslichem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease

Rattenleberzellkerne wurden bei einer Konzentration von 200 A 260-Einheiten/ml mit Eco R I (15000 U/ml) für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Lösliches Chromatin wurde durch Extraktion der Zellkerne in 0,2 mM EDTA, pH 8,0 dargestellt. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Chromatin-Fraktion wurde das lösliche Chromatin auf 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 und 0,3 mM $CaCl_2$ eingestellt und für 2 Min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mikrokokkus-Nuklease (Endkonzentration 1 U/ml) gestartet. Aliquots wurden nach 3, 10, 30 und 60 Min der Reaktionslösung entnommen und die Reaktion mit EDTA (Endkonzentration 5 mM) gestoppt. Die DNA wurde deproteinisiert und in 1,2% Agarose analysiert (4 V/cm, 3 Std.).

Bahn B: lösliches Eco R I-Chromatin vor Spaltung mit Mikrokokkus-Nuklease;

Bahn C, D, E, F:Nachspaltung von löslichem Eco R I-Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease für 3, 10, 30 und 60 Min;

Bahn G: zum Vergleich wurde DNA aus einer Spaltung von Rattenleberzellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease (80 U/ml, 2 Min bei 25°C) aufgetragen;

Bahn A enthält als Referenz-DNA λdvl mit Bsu, und λdvl mit Hind III gespalten.

Bereits nach 3 Min Inkubationszeit erscheint ein nukleosomales DNA-Muster mit einem Repeat von ca. 200 Np (Abb.14, C), vergleichbar dem Nukleosomenmuster nach kurzzeitiger Inkubation von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease (Abb.14, G). Im weiteren Verlauf der Spaltung werden die oligomeren Nukleosomen gespalten und mononukleosomale DNA wird angereichert. Gleichzeitig tritt eine Verkürzung der einzelnen Nukleosomenbanden ein.

Lösliches Chromatin zeigt prinzipiell ein ähnliches Verhalten beim Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease wie Chromatin im Zellkern (16). Es ist daher anzunehmen, daß lösliches Eco R I-Chromatin in einer intakten, nukleosomalen Struktur vorliegt.

Als weiterer Parameter zur Untersuchung der Struktur des Eco R I-Chromatins wurde die Kinetik des Abbaus mit DNAase II untersucht. Dieses Enzym zeigt, abhängig vom Kondensationsgrad des Chromatins, ein unterschiedliches Spaltungsverhalten (1,16). Bei tiefen Temperaturen (0°C) und im Ca^{2+}-freien Milieu wird die DNA im 200 Np-Repeat gespalten, bei höheren Temperaturen und bei Anwesenheit von Ca^{2+} erscheint jedoch die DNA im 100 Np-Muster gespalten. Dies konnte durch Untersuchungen sowohl an Mäuse- (1) als auch an Rattenleberzellkernen (16) gezeigt werden.

Die Kinetik der Nachspaltung von löslichem Eco R I-Chromatin mit DNAase II zeigt Abb.15. Die Reaktion verläuft unter diesen Bedingungen (DNAase II-Konzentration 5 U/ml) langsam; nach 10 Min Inkubationszeit ist noch kein Abbau festzustellen

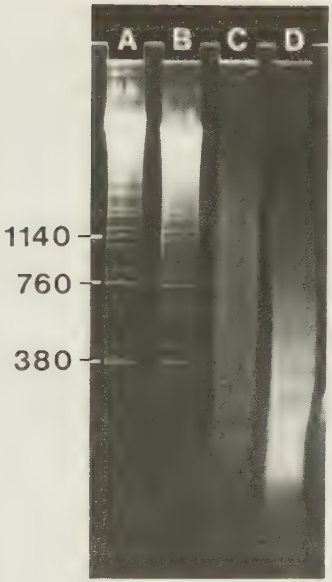

Abb.15: Nachspaltung von löslichem Chromatin mit DNAase II

Lösliches Chromatin wurde durch Inkubation von Rattenleberzellkernen (200 A 260-Einheiten/ml) mit Eco R I (15000 U/ml) für 3 Std. bei 37°C und anschließender Extraktion der Kerne in 0,2 mM EDTA, pH 8,0 dargestellt. Nach Zentrifugation wurde die Chromatinlösung auf 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe von DNAase II (Endkonzentration 5 U/ml) gestartet. Nach 10, 30 und 60 Min wurde die Reaktion durch Umpuffern mit Tris-HCl auf pH 8,7 gestoppt. Die DNA wurde deproteinisiert und auf 1,2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.
In Bahn A, B, C sind die Werte nach 10, 30 und 60 Min aufgetragen. Bahn D zeigt zum Vergleich das Spaltmuster der DNA, wie es nach Verdauung von Rattenleberzellkernen mit DNAase II auftritt (Inkubation 1 Std. bei 37°C mit 500 U/ml DNAase II). Größenangaben in Nukleotidpaaren.

(Abb.15, A), nach längerer Inkubationszeit (60 Min) tritt jedoch deutlich das 100 Np-Muster auf (Abb.15, C), wie es auch bei der Verdauung von Chromatin im Zellkern mit DNAase II gefunden wird (Abb.15, D).

Diese Ergebnisse der Nachspaltung von löslichem Eco R I-Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und mit DNAase II zeigen, daß Restriktionsnukleasen (Eco R I) geeignet erscheinen, lösliche Chromatin-Fraktionen auf schonende Art darzustellen, deren intakte, nukleosomale Struktur während des gesamten Präparationsvorgangs erhalten bleibt.

3 DISKUSSION

3.1 Charakterisierung der Satelliten-DNA der Ratte

Hoch-repetitive DNA-Anteile bei der Ratte sind bereits beschrieben worden (18, 42, 47, 50). Bei der Dichtegradientenzentrifugation können diese jedoch nicht von der Gesamt-DNA abgetrennt werden, im Gegensatz zu Satelliten aus anderen Spezies, bei denen die Isolierung von Satelliten-DNA mit dieser Technik möglich ist, z.B. bei der Maus (22) oder beim Rind (48). Deshalb wurde ein anderer Weg zur Identifizierung der Satelliten-DNA der Ratte erarbeitet. Wird Ratten-DNA mit Eco R I gespalten, so entsteht eine Reihe von Banden, die eine Zuordnung zu einer Satelliten-DNA erlauben. Die Molekülgrößen dieser multiplen Serie von Banden differieren jeweils um 95 Np. Im Endmuster verbleiben die mono- bis tetrameren Fragmente der 95 Np Einheit, sowie 7 weitere Fragmente, deren Molekülgrößen keine Relation zu diesem 95 Np-Register zeigen und deshalb zu anderen repetitiven Klassen zuzuordnen sind. Ein analoges Verhalten ergibt sich bei der Spaltung mit Hind III, allerdings besitzt das Hind III-Monomer eine Fragmentlänge von 380 Np und entspricht damit dem Tetrameren der 95 Np Einheit. Wenn man dieses Hind III-Monomer isoliert und mit Eco R I nachspaltet, so treten wieder Fragmente des 95 Np-Registers auf. Zusätzlich entstehen weitere Fragmente, die der Differenz der beiden Spaltstellen entsprechen. Damit ist gezeigt, daß beide Restriktionsnukleasen die gleiche Satelliten-DNA spalten.

Analog der Spaltung von Satelliten-DNA mit Restriktionsnukleasen in anderen Systemen (z.B. Maus-Satelliten-DNA mit Eco R II, Ref. 22) wird auch die Satelliten-DNA der Ratte weder

von Eco R I noch von Hind III vollständig zum Monomeren abgebaut; im Endmuster erscheinen neben dem Monomeren die jeweiligen di-, tri- und tetrameren Fragmente. Dies ist auf veränderte Spaltstellen zurückzuführen, entweder durch Mutation oder durch Modifizierung einzelner Nukleotide. Die Ursache für diese Divergenz liegt in dem für Satelliten-DNAs geringeren Selektionsdruck.

3.2 Chromationsolubilisierung und Isolierung von Satelliten-Chromatin

Die klassische Methode zur Präparation von löslichem Chromatin, bei der die Solubilisierung durch mechanisches Scheren erreicht wird (11), hat einen bedeutenden Nachteil: die reguläre nukleosomale Struktur des Chromatins wird hierbei weitgehend zerstört (39). Dagegen bietet die Darstellung von löslichem Chromatin in Form des limitierten Abbaus der DNA-Kette durch Restriktionsnukleasen einige Vorteile. Einerseits erfolgt die Spaltung der DNA aufgrund der Sequenzspezifität der eingesetzten Restriktionsnuklease an genau definierten Stellen; andererseits findet ein exonukleolytischer Abbau von freigesetzten Chromatin-Fraktionen, bei entsprechender Unterdrückung der endogenen Nukleaseaktivität, nicht statt (21). Damit sind Voraussetzungen geschaffen, die die Isolierung und Identifizierung von Satelliten-Chromatin ermöglichen.

Hohe Mengen an Restriktionsnuklease sind für die Solubilisierung von Chromatin aus Zellkernen erforderlich. Mit Eco R I werden maximal 34 - 38% lösliches Chromatin freigesetzt, wenn die Lyse der Zellkerne bei pH 8,0 erfolgt. Wird der pH-

Wert des Lysepuffers auf pH 7,5 reduziert, werden nur etwa 10% freigesetzt. Im Verlauf der Inkubationskinetik der Zellkerne mit Eco R I wird der Wert von 34 - 38% lösliches Chromatin bereits nach 90 Min erreicht; eine Verlängerung der Inkubationsdauer über mehrere Stunden führt zu keiner weiteren Erhöhung. Dieser typische Verlauf der Solubilisierungskinetik, der gekennzeichnet ist durch das Auftreten eines Plateau-Wertes, wird auch mit anderen Nukleasen gefunden und ist damit in Übereinstimmung mit dem Domänenmodell der Chromatinstruktur (25).

Die Auftrennung der DNA aus gespaltenem, aber unfraktioniertem Chromatin zeigt, daß Eco R I den Satelliten-DNA-Anteil häufig spaltet. Nach Fraktionierung des Chromatins enthält die lösliche Chromatin-Fraktion die doppelte Menge Satelliten-DNA im Vergleich zu unfraktioniertem Chromatin; es findet also eine präferentielle Freisetzung von Satelliten-Chromatin statt. Bei der Zentrifugation des löslichen Chromatins im Saccharosegradienten läßt sich eine Fraktion isolieren, die Satelliten-Chromatin (Heterochromatin) mit einer Reinheit von ca. 90% enthält.

Das DNA-Muster der löslichen Chromatin-Fraktion hat interessante Merkmale. Es zeigt die Multimeren des 95 Np-Registers in einer ähnlichen Weise, wie es bei Partialspaltung von isolierter Ratten-DNA mit Eco R I auftritt, allerdings bestehen deutliche Unterschiede. So ist das kleinste Fragment in der Chromatinspaltung das 380 Np-Fragment, nur gelegentlich konnten geringe Mengen einer Bande mit 190 Np entdeckt werden. Die Intensitäten der höheren Multimeren zeigen bei der Chromatinspaltung ein bestimmtes Verteilungsmuster,

nach je 3 starken Banden (z.B. 665, 760, 855 Np) folgt eine schwach angefärbte Bande (950 Np) usw. Dieses schwierig zu interpretierende DNA-Muster reflektiert einerseits die strukturelle Organisation des Satelliten-Chromatins, andererseits den Mechanismus der Spaltung mit Eco R I. Lipchitz und Axel (30), die Satelliten-Chromatin nach Spaltung von Kalbsthymuszellkernen mit Eco R I isolieren konnten, postulieren neben der Spaltung im internukleosomalen Bereich (Linker-Region) eine weitere Spaltstelle im Nukleosomenkern. Inwieweit diese Befunde auch hier zutreffen, läßt sich anhand des DNA-Spaltmusters nicht entscheiden. Aufgrund statistischer Analysen (25) erscheint jedoch eine intranukleosomale Spaltung eher unwahrscheinlich.

Verschiedene Kriterien sprechen für das Vorliegen einer nukleosomalen Struktur des löslichen Chromatins und damit auch des Satelliten-Chromatins: sowohl die Histonanalyse als auch das Verhalten des gelösten Chromatins bei der Nachspaltung mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase II zeigen ähnliche Ergebnisse, wie sie für das Chromatin im Zellkern gefunden werden.

4 MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 Materialien

Acrylamid und Triton X-100 waren Produkte der Firma Serva, Heidelberg. Seakem Agarose war von Marine Colloids Inc., Rockland, Maine. Mikrokokkus-Nuklease (E.C.3.1.4.7) und DNAase II (E.C.3.1.4.6) wurden von Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, bezogen. Proteinase K war von E. Merck, Darmstadt, ^{3}H-Thymidin (26 Ci/mMol) von New England Nuclear, Dreieichenhein.

4.2 Präparation von Rattenleberzellkernen

Zur Isolierung von Zellkernen aus Rattenleber wurde im Prinzip nach der Methode von Hewish und Burgoyne (20) verfahren. Männliche Ratten (150-200 g) wurden dekapitiert, die Leber entnommen und in eisgekühltem Puffer A (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 15 mM Tris-HCl, pH 7,4) grob zerkleinert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das grob zerkleinerte Lebergewebe wurde mit einem Teflonstempel in einem Glaskolben (Potter) homogenisiert, durch Gaze filtriert und abzentrifugiert (Christ-Laborzentrifuge, 5000 Upm, 5 Min). Die pelletierten Zellkerne wurden in wenige ml Puffer A suspendiert und in einem Gradienten von 1,37 - 2,2 M Saccharose für 1 Std. bei 100000 x g zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, SW 27 Rotor). Die gereinigten Zellkerne wurden in Puffer A,

der 0,2 mM EDTA und 0,2 mM EGTA enthielt, resuspendiert und in diesem Puffer 3 x gewaschen und anschließend bei 5000 x g für 2 Min pelletiert. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Während einer Lagerungsdauer von mehreren Monaten unter diesen Bedingungen wurde keine Veränderung im Spaltungsmuster der DNA nach Verdauung mit Mikrokokkus-Nuklease beobachtet.

4.3 Präparation von ^{3}H-Thymidin markierten Zellkernen

Zur Inkorporation von ^{3}H-Thymidin wurde 30 Std. nach partieller Hepatektomie der Ratten (Äthernarkose, ca. 4/5 der Leber entfernt) 0,2 mCi ^{3}H-Thymidin in 1 ml 0,15 M NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 intraperitoneal injiziert (57). Nach 2 Tagen wurden die Ratten dekapitiert und die Zellkerne wie unter 4.2 beschrieben, isoliert.

4.4 Nuklease-Verdauungen von Zellkernen

4.4.1 Inkubation von Zellkernen mit Restriktionsnuklease Eco R I

Die tiefgefrorenen Zellkerne wurden vor jeder Inkubation mit Puffer B (65 mM NaCl, 60 mM KCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 15 mM Tris-HCl, pH 7,4) durch vorsichtiges Homogenisieren gewaschen und abzentrifugiert (3000 Upm, 5 Min). Die gewaschenen Kerne wurden im Eisbad in diesem Puffer, der

10 mM $MgCl_2$ enthielt, zusammen mit der jeweils in den Bildlegenden angegebenen Menge Eco R I suspendiert (die Kernkonzentration betrug 200 A 260-Einheiten/ml). Zusätzlich enthielten alle Inkubationsansätze Glyzerin (bis zu 5%) und Triton X-100 (bis zu 0,02%), da diese Komponenten im Lagerungspuffer von Eco R I enthalten waren. Die Reaktion wurde gestartet durch Erwärmen des Inkubationsgemisches auf 37°C. Während der Inkubation wurde die Kernsuspension gelegentlich geschüttelt, um ein Zusammenklumpen der Kerne zu vermeiden. Bei Untersuchungen der Verdauungskinetik wurden nach definierten Zeiten Aliquots dem Reaktionsansatz entnommen und die Reaktion durch Zugabe des 24fachen Volumens Puffer B, dem 5 mM EDTA, 0,2 mM EGTA und 0,2% Triton X-100 zugesetzt waren, im Eisbad gestoppt. Die Kerne wurden abzentrifugiert (2 Min bei 2000 x g) und im gleichen Puffer (der jedoch kein Triton X-100 enthielt) nochmals gewaschen. Die DNA wurde aus den Kernen isoliert (s. 4.7), die Überstände wurden zur Analyse der Proteine vereinigt (s. 4.9.4).

4.4.2 Inkubation von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease

Zellkerne wurden nach dem Auftauen mit Puffer B gewaschen und bei einer Kernkonzentration von 10 A 260-Einheiten in Puffer B, der 2 mM $CaCl_2$ enthielt, suspendiert. Die Kerne wurden auf 37°C gebracht und die Reaktion durch Zugabe von Mikrokokkus-Nuklease (Endkonzentration 100 U/ml) gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion im Eisbad mit 20 mM EDTA (Endkonzentration) gestoppt. Bei Untersuchungen über den Einfluß von Triton X-100 wurden die Kerne vor Zugabe der Nuklease mit steigenden Mengen Triton

X-100 (0,001 - 0,1%) versetzt und für 30 Min bei 37°C vorinkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte ebenfalls wie unter 4.7 angegeben.

4.4.3 Nachspaltung von löslichem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und mit DNAase II

Lösliches Chromatin wurde nach Inkubation der Zellkerne mit Eco R I und anschließender Lyse dargestellt (s. 4.5). Die Chromatinlösung wurde auf 10 mM Tris-HCl, 0,3 mM $CaCl_2$, pH 7,6 eingestellt und die Reaktion entweder durch Zugabe von Mikrokokkus-Nuklease (1 U/ml) oder DNAase II (5 U/ml) gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion mit 5 mM EDTA (bei Nachspaltung mit Mikrokokkus-Nuklease) oder durch Umpuffern auf pH 8,7 (Nachspaltung mit DNAase II) gestoppt. Die DNA wurde, wie unter 4.7 beschrieben, isoliert.

4.5 Lyse der Zellkerne

Nach der Nukleaseverdauung mit Eco R I wurden die gewaschenen Kerne rasch mit Extraktionspuffer versetzt (0,2 mM EDTA, mit Tris-Base auf pH 8,0 eingestellt) (nach Ref. 39). Die Konzentration des lysierten Chromatins (bezogen auf den DNA-Gehalt) variierte dabei von 4,5 - 16 A 260-Einheiten/ml. Die Extraktion des löslichen Chromatins erfolgte bei 0 - 4°C für mehrere Std. unter gelegentlichem Schütteln der Lösung. Nach vollständiger Lyse der Kerne wurde bei 1000 x g und 4°C für 15 Min abzentrifugiert. Die lösliche Chromatin-Fraktion im

klaren Überstand wurde vorsichtig von unlöslichem Chromatin, das als Gel im Pellet vorlag, mit der Pipette abgetrennt. Die Menge des Chromatins in den einzelnen Fraktionen wurde über den DNA-Gehalt bestimmt, entweder durch Messung der Absorption bei 260 nm oder durch Bestimmung der Radioaktivität an ^{3}H-DNA. Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Nuclear Chicago) nach vollständiger Verbrennung der Proben im Verbrennungsautomaten (Oxymat, Deutsche Intertechnique, Mainz).

4.6 Restriktionsnukleasen

Hind III, isoliert aus Hämophilus influenzae R_d, wurde von R.E. Streeck zur Verfügung gestellt. Die Isolierung erfolgte nach Ref.54, Trennung von Hind II und Hind III wurde nach Ref. 47 durchgeführt. Eco R I wurde anfangs ebenfalls von R.E. Streeck zur Verfügung gestellt.

4.6.1 Isolierung der Restriktionsnuklease Eco R I

Die Isolierung und Reinigung von Eco R I erfolgte nach Greene et al. (14), modifiziert nach Ref. 15.

210 g Zellen Escherichia coli Stamm RY 13 (Microbial Research Establishment, Porton, England) wurden in Extraktionspuffer (10 mM KH_2PO_4, 7 mM β-Merkaptoäthanol, 1 mM EDTA, pH 7,0 = EP) suspendiert und auf 400 ml aufgefüllt. Beschallung erfolgte mit maximaler Energie in Intervallen von 5 Min, wobei eine Temperatur von 10°C nicht überschritten wurde (Äthanol-Eis-Bad),

bis die Absorption bei 580 nm 1/10 des Ausgangswertes betrug. Nach Zentrifugation (Spinco, Rotor Ti 45, 1 Std. bei 37000 Upm, 4°C) wurde der Überstand (300 ml) mit EP auf 500 ml gebracht und zur Abtrennung der DNA 175 ml einer frisch zubereiteten 5% (w/v) Streptomycinsulfatlösung innerhalb von 30 Min unter Rühren zugetropft. Nach weiteren 30 Min Rühren wurde abzentrifugiert (Sorvall GSA Rotor, 10000 x g, 30 Min, 4°C) und der Überstand (655 ml) mit der gleichen Menge gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefällt (Zutropfen innerhalb 30 Min, dann über Nacht stehen gelassen). Nach Zentrifugation (Sorvall GSA Rotor, 10000 x g, 30 Min, 4°C) wurde der Niederschlag in 250 ml EP, 0,2 M NaCl gelöst und zur Entfernung des Ammoniumsulfats 3 x gegen diesen Puffer dialysiert. Chromatographische Auftrennung erfolgte über eine Phosphocellulosesäule (40 x 4 cm, Whatman P 11 Phosphocellulose, äquilibriert mit EP, 0,2 M NaCl), die nach dem Auftragen der Probe mit 2 l dieses Puffers gewaschen wurde. Eluiert wurde mit folgenden Gradienten: 2 l EP, 0,2 M NaCl, pH 7,0 und 2 l EP, 0,8 M NaCl, pH 6,5. Die Eco R K Aktivität lag zwischen 0,45 - 0,6 M NaCl. Zur Stabilisierung der Enzymaktivität wurden die vereingten aktiven Fraktionen (1500 ml) mit Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 0,2%) und über eine Hydroxyapatitsäule (10 x 2 cm, äquilibriert mit EP, 0,2 M NaCl, 0,2% Triton X-100, pH 7,0) konzentriert (Elution mit 0,5 M KH_2PO_4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM β-Merkaptoäthanol, 0,2% Triton X-100, pH 7,0). Nach Dialyse gegen EP, 0,2 M NaCl, 0,2% Triton X-100, pH 7,0 wurde abweichend von Ref. 14 nicht über Carboxymethylcellulose chromatographiert, sondern gleich gegen EP, 0,2 M NaCl, 50% (v/v) Glyzerin dialysiert, wobei eine Konzentrierung um den Faktor 3 erreicht wurde. Das Enzym wurde in diesem glyzerinhaltigen Puffer bei - 20°C aufbewahrt. Un-

ter diesen Bedingungen war Eco R I über mehrere Monate lang stabil, erst nach 6 Monaten trat ein Aktivitätsverlust auf.

Die Aktivität des Enzyms wurde mit SPP 1-, λb2- und λdv 1-Phagen-DNA getestet (SPP 1 Phagen-DNA von W. Hörz, λb 2- und λdv 1-Phagen DNA von R.E. Streeck). Die Gesamtausbeute betrug 6 x 10^6 Einheiten [1] (entsprechend 32% der Aktivität im 100000 x g Überstand). Die spezifische Aktivität des isolierten Enzyms war um das 300fache höher im Vergleich zum 100000 x g Überstand. Das Enzym zeigte noch volle Aktivität bei einer Verdünnung von 1 : 15000; Partialspaltung war noch bei 1 : 50000 zu erkennen. Selbst nach einer Inkubationszeit von 16 Std. konnte keine weitere nukleolytische Aktivität entdeckt werden, erst bei einem 150fachen Überschuß von Eco R I trat nach 16 Std. Inkubationsdauer eine Nebenaktivität auf, bei der es sich wahrscheinlich um Eco R I* (49) handelte.

4.6.2 Abtrennung des Triton X-100 von Eco R I über Hydroxyapatit

Der Zusatz von Triton X-100 (0,2%) zum Lagerungspuffer von Eco R I erhöht die Stabilität des Enzyms (14). Da es bei einigen Versuchen notwendig war, Eco R I ohne Triton einzusetzen, wurde das Detergens über eine Hydroxyapatitsäule von Eco R I abgetrennt. Eine kleine HAP-Säule (Pasteur-

1) Eine Einheit ist definiert als die Menge Enzym, die erforderlich ist, um 1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl innerhalb 1 Std. bei 37°C zu Ende zu spalten.

pipette, 0,5 ml) wurde zuerst mit 50 ml 20 mM KH_2PO_4, 0,2 M NaCl, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 5 mM EDTA, 10% Glyzerin, pH 7,4, dann mit dem gleichen Puffer ohne EDTA (50 ml) äquilibriert. Nach Auftragen des Enzyms wurde mit 15 ml 0,15 M KH_2PO_4, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 10% Glyzerin, pH 7,4 gewaschen und Eco R I mit 0,6 M KH_2PO_4, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 10% Glyzerin, pH 7,4 eluiert (1 ml Fraktionen). Die aktiven Fraktionen (2. und 3. Fraktion) wurden gegen 20 mM KH_2PO_4, 1 mM EDTA, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 0,2 M NaCl, 10% Glyzerin, pH 7,4 dialysiert (2 l) und nach Einengen nochmal gegen diesen Puffer dialysiert, der jedoch kein Glyzerin enthielt. Die Aktivität dieses gereinigten Enzyms ohne Triton X-100 betrug jedoch nur noch 1/30 der ursprünglichen Aktivität.

4.7 Isolierung von DNA

Sowohl hochmolekulare, ungespaltene DNA als auch gespaltene DNA nach Verdauung von Zellkernen mit Nuklease wurden nach dem gleichen Verfahren isoliert. Zellkerne wurden in 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0 aufgenommen, mit SDS (Endkonzentration 0,4%, w/v) versetzt und mit Proteinase K (200 µg/ml) für 5 Std. oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach zweimaliger Extraktion mit Phenol (gleiches Vol.) wurde die DNA mit dem 2fachen Vol. Äthanol bei - 20°C gefällt (14 Std.). Nach Zentrifugation (10000 x g, 2 Min) wurde die DNA in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, pH 7,5 aufgenommen.

In einigen Experimenten wurde zur Entfernung von RNA die mit Äthanol gefällte DNA in 50 mM Acetatpuffer (pH 5,3) aufgelöst und mit 20 U/ml Ribonuklease T_2 für 5 Std. bei 37° inkubiert. Danach wurde zweimal mit Phenol extrahiert,

mit dem 2fachen Vol. Äthanol (-20°C) gefällt und die DNA in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, pH 7,5 aufgenommen.

4.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

Im allgemeinen wurden die Spaltungen von DNA, um vergleichbare Bedingungen zu Chromatinspaltungen herzustellen, in Puffer B (s. 4.4.1), der 10 mM $MgCl_2$ enthielt, ausgeführt. Daneben wurde bei Spaltungen mit Eco R I ein Puffer mit 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM β-Merkaptoäthanol, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,4 (49), mit Hind III ein Puffer mit 7 mM Tris-HCl 60 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 5 mM β-Merkaptoäthanol, pH 7,4 (51) verwendet. Spaltungen erfolgten bei DNA-Konzentrationen von 20 - 30 µg/100 µl; die Reaktionstemperatur war 37°C und die Inkubationsdauer variierte von 2 - 6 Std. Die Menge des zugesetzten Enzyms war ausreichend, um die eingesetzte DNA innerhalb von 2 Std. vollständig zu spalten. Zur Nachspaltung von präparativ isolierten DNA-Fragmenten (s. 4.9.2) wurde die 10 - 20fache Enzymmenge eingesetzt, da diese gelelektrophoretisch isolierten DNA-Fragmente eine verringerte Spaltbarkeit zeigten. Die Reaktion wurde mit 20 mM EDTA, 0,5 M NaCl (Endkonzentration) gestoppt und die DNA nach Fällung mit Äthanol in Tris-Puffer (s. 4.7) aufgenommen.

4.9 Gelelektrophorese

4.9.1 Analytische Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden vertikale Agarose-Plattengele (14 x 24 x 0,25 cm) bei einer Agarosekonzentration von 0,8 - 1,5% verwendet. 0,1 - 0,15 A 260-Einheiten DNA wurden pro Bahn aufgetragen und die Elektrophorese in Tris-Borat-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3, Ref. 43) bei 4 V/cm für 3 - 3,5 Std. durchgeführt. Die DNA wurde entweder durch Zugabe von 1 µg/ml Äthidiumbromid zum Elektrophoresepuffer oder nach der Elektrophorese für 30 Min in 1 µg/ml Äthidiumbromid angefärbt (16). Die gefärbten Gele wurden im UV-Durchlicht photographiert (46) und die Negative densitometriert.

4.9.2 Präparative Gelelektrophorese zur Isolierung von Restriktionsfragmenten

Die Isolierung von Restriktionsfragmenten im präparativen Maßstab erfolgte in abgeänderter Form nach Ref. 52. Jeweils 0,3 A 260-Einheiten gespaltene DNA wurden auf Agarose-Rundgele (18 x 0,6 cm) aufgetragen und die Fragmente für 7 Std. bei 3 V/cm in 36 mM Tris-HCl, 30 mM KH_2PO_4, 1 mM EDTA, pH 7,7 aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mit 1 µg/ml Äthidiumbromid für 20 Min wurden die fluoreszierenden Banden unter UV-Licht (360 nm) ausgeschnitten und die Gelstücke mit entsprechenden Banden in ein 0,8% Agarose-Rundgel (18 x 2 cm) einpolymerisiert. Nach Überschichten des Gels mit 1,5 ml DE 52 wurde die DNA mit umgekehrter Polarität

für 14 Std. bei 1 V/cm herauselektrophoretisiert. Die DE 52-Schicht wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben und auf eine DE 52-Säule (2 x 0,5 cm, äquilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,6) übertragen, mit 30 ml 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,15 M NaCl, pH 7,6 gewaschen und mit 1,5 ml dieses Puffers, der jedoch 1 M NaCl enthielt, eluiert. Nach Fällung mit Äthanol wurde die DNA in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 aufgenommen. Ein anderes Verfahren, bei dem die DNA in eine an das Rundgel angeschlossene Kammer elektrophoretisch eluiert wurde, führte zur Isolierung von DNA-Fragmenten, deren Spaltbarkeit mit weiteren Restriktionsnukleasen durch Verunreinigung stark reduziert war und auch durch weitere Reinigung über Hydroxyapatit nicht wiederhergestellt werden konnte.

4.9.3 Bestimmung der Fragmentlängen

Die Kettenlängen der Restriktionsfragmente wurden durch Koelektrophorese mit folgenden DNA-Fragmenten bekannter Länge bestimmt: λdv 1-Phagen-DNA, gespalten mit Hind III (55); λdv 1-Phagen-DNA, gespalten mit Bsu (56) (beide von R.E. Streeck); Maus Satelliten-DNA, partiell gespalten mit Eco R II (22, von W. Hörz) und α-Satelliten-DNA von African Green Monkey Zellen, partiell gespalten mit Hind III (10, von F. Fittler).

4.9.4 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Elektrophorese der Proteine aus fraktioniertem und unfraktioniertem Chromatin erfolgte in vertikalen Polyacrylamidplattengelen nach der Methode von Lämmli (28). Das Trenngel enthielt 11% Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 27,5 : 1), 0,375 M Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8. Die Polymerisation erfolgte mit 0,1% TEMED, 0,1% Ammoniumpersulfat über Nacht. Das Sammelgel enthielt 3% Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 15 : 1), 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8 und wurde ebenfalls mit 0,1% TEMED und 0,1% APS polymerisiert. Die Proben wurden entweder direkt im Probenpuffer nach Lämmli (28) (0,0625 M Tris-HCl, 2% SDS, 5% β-Merkaptoäthanol, 10% Glyzerin, 0,005% Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen (inkubierte Zellkerne), oder zuerst mit 20% TCA, 0,1% SDS gefällt (30 Min bei 4°C) und dann in Probenpuffer aufgenommen (lösliches Chromatin und Proteine im 1. Überstand). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 3 Min bei 100°C gekocht. Pro Bahn wurden 0,4 - 0,8 A 260-Einheiten (bezogen auf den DNA-Gehalt) aufgetragen. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel mit 50 V, im Trenngel anfangs mit 100 V, wobei die Spannung während des Laufs auf 220 V gesteigert wurde, für insgesamt 7,5 Std. unter Wasserkühlung. Das Gel wurde über Nacht mit 0,05% Coomassie Blue G-250 in 10% Essigsäure, 25% Isopropanol, anschließend für 16 Std. mit 0,025% Coomassie Blue G-250 in 10% Essigsäure, 10% Isopropanol gefärbt und mit 10% Essigsäure entfärbt (6).

4.10 Saccharosegradientenzentrifugation

Je 3 A 260-Einheiten lösliches Chromatin wurden auf isokinetische 5 - 20% Saccharosegradienten (Partikeldichte 1,51, Ref. 33) aufgetragen. Die Saccharoselösung enthielt 0,2 mM EDTA und wurde mit Tris auf pH 8,0 eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte bei 40000 Upm für 4 Std. bei 4°C (Beckmann Spinco Ultrazentrifuge, SW 41 Rotor). Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten von unten nach oben fraktioniert (33). In den Boden der Gradientenröhrchen wurde eine Kanüle eingestochen und die Saccharoselösung mit 40% Kalium-Natrium-Tartratlösung, die mit Bromphenolblau angefärbt war, hochgepumpt und die Absorption bei 260 nm mit einer Durchflußküvette kontinuierlich registriert (Zeiss-Photometer). Entsprechende Fraktionen (2 ml) aus mehreren Gradienten wurden vereinigt und die DNA zur Gelelektrophorese isoliert.

5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präparation von Satelliten-DNA enthaltenden Chromatin-Fraktionen (Heterochromatin) aus Rattenleberzellkernen mit Hilfe der Restriktionsnuklease Eco R I untersucht. Ziel war es, die heterochromatischen Chromatin-Fraktionen in möglichst reiner Form darzustellen und diese näher zu charakterisieren.

Die Isolierung der Satelliten-DNA der Ratte erwies sich als recht schwierig, da sie durch die üblichen Methoden der CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation und ihrer Varianten nicht abtrennbar ist. Deshalb wurden alternative Methoden zur Charakterisierung und Isolierung erarbeitet. Eine Analyse der Kinetik des Abbaus der DNA der Ratte mit Restriktionsnukleasen gestattete eine teilweise Charakterisierung des Satelliten. Aus dem Auftreten von Banden mit der Kettenlänge von 380 Np und ganzzahliger Vielfacher dieser Einheit nach Verdauung mit Hind III konnte geschlossen werden, daß die Satelliten-DNA der Ratte aus wiederholten 380 Np langen Einheiten aufgebaut ist. Mit Hilfe der Restriktionsnuklease Eco R I sowie durch "Mischspaltungen" mit beiden Nukleasen konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die 380 Np Einheit aus nicht identischen 95 Np Untereinheiten aufgebaut ist. Der Anteil der Satelliten-DNA am Rattengenom wurde durch Densitometrie von Agarosegelen zu 7% bestimmt.

Weitere Fragmente, die nach Spaltung der DNA sowohl mit Hind III als auch mit Eco R I zu beobachten war, entstammen nicht

der Satelliten-DNA, sondern müssen mittel-repetitiven Sequenzen zugeordnet werden.

Der Einsatz von Restriktionsnukleasen zur Verdauung ganzer Zellkerne führte zu einer neuen Methode zur Darstellung von Heterochromatin. Zunächst mußten jedoch geeignete Bedingungen erarbeitet werden, um Zellkerne durch Eco R I vollständig zu verdauen und Chromatin aus den verdauten Zellkernen zu extrahieren. Hohe Konzentrationen an Restriktionsnuklease waren erforderlich. Der Anteil des löslichen Chromatins war von den Lysebedingungen abhängig und betrug maximal 34 - 38%. Dieser Wert wurde im Verlauf der Verdauungskinetik mit Eco R I nach 90 Min erreicht und stieg auch nach längerer Inkubationszeit nicht weiter an. Diese eingeschränkte Extrahierbarkeit von Chromatin aus Zellkernen war ein überraschender Befund, ließ sich jedoch durch das "Domänen Modell" der Chromatinstruktur zwanglos erklären (25).

Die intakte nukleosomale Struktur des löslichen Chromatins blieb nach dem Solubilisierungsschritt erhalten. Aus dem Zellkern gelöstes Chromatin enthielt alle 5 Histone. Mit Mikrokokkus-Nuklease wurde lösliches Chromatin im nukleosomalen Raster gespalten und mit DNAase II wurde ein für dieses Enzym typischer Abbau im 100 Np-Raster (1) gefunden.

Mit Hilfe der Restriktionsnuklease Eco R I, die den Satelliten alle 95 NP, jedoch die übrige DNA des Genoms wesent-

lich weniger häufig spaltet, ließ sich der Satellit bevorzugt verdauen. Diese Chromatin-Fraktion ließ sich auch bevorzugt aus dem Zellkern extrahieren, was zu einer beträchtlichen Anreicherung dieser Fraktion führte. In einem zweiten Schritt konnte das aus kürzeren DNA-Ketten bestehende Satelliten-DNA enthaltende Heterochromatin an Hand einer Größentrennung durch Saccharosegradienten mit einem Reinheitsgrad von ca. 90% isoliert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß dieses Modell geeignet erscheint, weitere Untersuchungen über die Struktur des Chromatins, insbesonders über die Struktur und Zusammensetzung von Heterochromatin, durchzuführen.

6 ANHANG: ÜBERSICHT ÜBER NEUERE ERGEBNISSE

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 1976/77 durchgeführt. Es sollen hier neuere Daten vorgestellt werden, welche die weitere Entwicklung auf diesem Gebiet aufzeigen.

M. Fuke und H. Busch untersuchten die Spaltung von Ratten-DNA aus Novikoff Hepatom-Aszites-Zellen mit den 4 Restriktionsnukleasen Eco R I, Hind III, Hinf I und Hae III (12). Mit Hind III und Hae III wurden jeweils Fragmente von 372 Np Länge gefunden, deren Spaltstellen um 199 bzw. 173 Np versetzt sind. Eco R I und Hinf I produzierten Fragmente mit einer Länge von 93 Np, deren Spaltstellen um 21 bzw. 72 Np versetzt sind. Diese Satelliten-DNA wurde von M. Fuke et al. (13) innerhalb des Zellkerns näher lokalisiert; es konnte gezeigt werden, daß das Hind III-Monomer zu 80% im Nukleolus enthalten ist.

Die vollständige Nukleotidsequenz der Ratten-Satelliten-DNA wurde von M. Pech et al. (44) aufgeklärt. Hochmolekulare Satelliten-DNA wurde durch Spaltung von Ratten-DNA mit Sau 3AI, ein Enzym, das den Satelliten-Anteil nicht spaltet, und anschließender chromatographischer Auftrennung rein dargestellt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Technik von Maxam und Gilbert (33). Diese DNA-Komponente, die als 'Ratten-Satelliten-DNA I' bezeichnet wurde,

besteht aus tandemartig angeordneten 370 Np-Fragmenten (Hind III Fragmente), die aus alternierenden Fragmenten von 92 und 93 Np Länge zusammengesetzt sind (Eco R I-Fragmente). Die Fragmente mit 92 bzw. 93 Np besitzen homologe, aber nicht identische Sequenzen, das 93 Np-Fragment wurde als Grundeinheit der Rattensatelliten-DNA I definiert.

In ihrer Untersuchung über die Beziehung zwischen Satelliten-DNA-Gehalt und Chromosomen-Translokation bei 3 verschiedenen Ratten-Genomen konnten G.L.G. Miklos et al. (35) in 2 Fällen (Rattus villosissimus und Rattus sordidus) keine mit Eco R I spaltbare Satelliten-DNA nachweisen, jedoch wurden bei Rattus norvegicus nach Spaltung der DNA mit Eco R I 2 Fragmente mit 95 und 190 Np gefunden, die der Ratten-Satelliten-DNA I zuzuordnen sind.

Unterschiede in den nukleosomalen Repeat-Längen von Satelliten-Chromatin und Gesamt-Chromatin bei der Ratte wurden von A. Omori et al. (40) gefunden. Satelliten-Chromatin hat einen nukleosomalen Repeat von 185 Np und hat damit eine um 10 Np verkürzte Repeat-Länge gegenüber dem Gesamt-Chromatin. Dieser Unterschied konnte nicht durch verschiedene Proteinzusammensetzung erklärt werden, da in beiden Chromatinarten eine ähnliche Histonverteilung gefunden wurde.

P.R. Musich et al. (36) verglichen die Repeat-Längen der Satelliten-DNAs von 6 Säugetierarten (Affe, Maus, Schaf, Mensch, Rind und Ratte) mit der nukleosomalen DNA-Länge. Sie schlugen ein Modell vor, nach dem die nukleosomale Struktur ein notwendiges Element bei der Entstehung und Evolution repetitiver DNA-Sequenzen sei und postulierten eine einfache Phasenrelation zwischen den repetitiven DNA-Sequenzen und den nukleosomalen Proteinen.

Die Beziehung zwischen repetitiver Nukleotid-Sequenz der DNA-Kette und Position der Nukleosomen wurde von T. Igo-Kemenes et al. (24) untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß im Satelliten-Chromatin bei der Ratte etwa die Hälfte der Nukleosomen eine definierte Position zur DNA-Sequenz einnehmen, und zwar in 3 verschiedenen Anordnungen. Die andere Hälfte der Nukleosomen ist dagegen in weniger bevorzugten, bislang nicht näher definierten Positionen zu finden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1) Altenburger W., Hörz W. u. Zachau H.G. (1976) Nature 264, 517-522

2) Bradbury E.M., Dauby S.E., Rattle H.W.E. u. Giancotti V. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 97-105

3) Carpenter B.G., Baldwin J.P., Bradbury E.M. u. Ibel K. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 1739-1746

4) Crick F.H.C. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 1-3

5) Elgin S.C.R. u. Weintraub H. (1975) Ann. Rev. Biochem. 44, 725-774

6) Fairbanks G., Stech T.L. u. Wallach D.F.H. (1971) Biochemistry 10, 2606-2617

7) Felsenfeld G. (1978) Nature 271, 115-122

8) Finch J.T. u. Klug A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897-1901

9) Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levitt M. u. Klug A. (1977) Nature 269, 29-36

10) Fittler F. (1977) Eur. J. Biochem. 74, 343-352

11) Frenster J., Allfrey V.G. u. Mirsky A.E. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50, 1026-1032

12) Fuke M. u. Busch H. (1979) FEBS Letters 99, 136-140

13) Fuke M., Davis F.M. u. Busch H. (1979) FEBS Letters 102, 46-50

14) Greene P.J., Betlach M.C., Boyer H.W. u. Goodman H.M. (1974) Methods Mol. Biol. 7, 87-111

15) Greene P.J., Poonian M.S., Nussbaum A.L., Tobias L., Garfin D.E., Boyer H.W. u. Goodman H.M. (1975) J. Mol. Biol. 99, 237-261

16) Greil W., Igo-Kemenes T. u. Zachau H.G. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 2633-2644

17) Griffith J.D. u. Christiansen G. (1978) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 19-35

18) Guttan T., Votavova H. u. Pivec L. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 835-845

19) Hedgpeth J., Goodman H.M. u. Boyer H.W. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3448-3452

20) Hewish D.R. u. Burgoyne L.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510

21) Hörz W., Igo-Kemenes T., Pfeiffer W. u. Zachau H.G. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 3213-3226

22) Hörz W. u. Zachau H.G. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 383-392

23) Igo-Kemenes T., Hörz W. u. Zachau H.G. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 89-121

24) Igo-Kemenes T., Omori A. u. Zachau H.G. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 5377-5390

25) Igo-Kemenes T. u. Zachau H.G. (1978) Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 42, 109-118

26) John B. u. Miklos G.L.G. (1979) Int. Rev. Cytology 58, 1-108

27) Kornberg R.D. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 931-954

28) Lämmli U.K. (1970) Nature 227, 680-685

29) Leake R.E., Trench M.E. u. Barry J.M. (1972) Exp. Cell Res. 71, 17-26

30) Lipchitz L. u. Axel R. (1976) Cell 9, 355-364

31) Marushige K. u. Bonner J. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2941-2944

32) Maxam A.M. u. Gilbert W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 560-564

33) McCarthy K.S. Jr, Vollmer R.T. u. McCarthy K.S. (1974) Analyt. Biochem. 61, 165-183

34) McGhee J.D. u. Felsenfeld G. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 1115-1156

35) Miklos G.L.G., Willcocks D.A. u. Baverstock P.R. (1980) Chromosoma (Berl.) 76, 339-363

36) Musich P.R., Maio J.J. u. Brown F.L. (1977) J. Mol. Biol. 117, 657-677

37) Noll M. (1974) Nature 251, 249-251

38) Noll M. (1974) Nucl. Acids Res. 1, 1573-1578

39) Noll M., Thomas J.O. u. Kornberg R.D. (1975) Science 187, 1203-1206

40) Omori A., Igo-Kemenes T. u. Zachau H.G. (1980) Nucl. Acids Res. 8, 5363-5375

41) Pardon J.F., Worcester D.L., Wooley J.C., Cotter R.J., Lilley D.M. u. Richards B.M. (1977) Nucl. Acids Res. 4, 3199-3214

42) Pays E. u. Rousse A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 862-867

43) Peacock A.C. u. Dingman C.W. (1967) Biochemistry 6, 1818-1827

44) Pech M., Igo-Kemenes T. u. Zachau H.G. (1979) Nucl. Acids Res. 7, 417-432

45) Pederson Th. (1978) Int. Rev. Cytology 55, 1-22

46) Pfeiffer W., Hörz W., Igo-Kemenes T. u. Zachau H.G. (1975) Nature 258, 450-452

47) Philippsen P., Streeck R.E. u. Zachau H.G. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 479-488

48) Philippsen P., Streeck R.E., Zachau H.G. u. Müller W. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 55-68

49) Polisky B., Greene P., Garfin D.E., McCarthy B.J., Goodman H.M. u. Boyer H.W. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3310-3314

50) Roizes G. (1974) Nucl. Acids Res. 1, 1099-1120

51) Smith H.O. (1974) Meth. Mol. Biol. 7, 71-86

52) Smith H.O. u. Birnstiel M.L. (1976) Nucl. Acids Res. 3, 2387-2398

53) Smith H.O. u. Nathans D. (1973) J. Mol. Biol. 81, 419-423

54) Smith H.O. u. Wilcox K. (1970) J. Mol. Biol. 51, 379-391

55) Streeck R.E. u. Hobom G. (1975) Eur. J. Biochem 57, 595-606

56) Streeck R.E. u. Zachau H.G. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 267-279

57) Takatsuka Y., Kohno M., Higashi K., Hirano H. u. Sakamoto Y. (1976) Exp. Cell Res. 103, 191-199

58) Wilson G.A. u. Young F.E. (1975) J. Mol. Biol. 97, 123-125

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die Abkürzungen für die Restriktionsnukleasen erfolgten wie in Ref. 53 angegeben.

A, G, C, T	Desoxyribonukleotide
A 260	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
Bsu	Restriktionsnuklease aus Bacillus subtilis Stamm X5
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase II	Desoxyribonuklease (saure) aus Schweinemilz
Eco R I	Restriktionsnuklease aus Escherichia coli RY 13
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N, N'-tetraessigsäure
Hind III	Restriktionsnuklease aus Hämophilus influenzae R_d
λdv 1	Desoxyribonukleinsäure des Bakteriophagen λdv 1
mM	millimolar

Min	Minute(n)
ml	Milliliter
Np	Nukleotidpaar(e)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyläthyl-endiamin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

LEBENSLAUF

Am 6. April 1949 wurde ich als Sohn des Bäckers und Lageristen Joseph Greil und seiner Ehefrau Therese, geb. Neumayr, in München geboren. Von 1955 bis 1961 besuchte ich die Volksschule an der Türkenstr. und anschliessend das Pestalozzi-Gymnasium in München, wo ich 1968 das Abitur ablegte. Ab 1968 studierte ich an der Universität München Chemie. Das Studium beendete ich 1976 mit dem Hauptdiplom. Die Diplomarbeit mit dem Thema "Studien zum Abbau von Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und Desoxyribonuklease II" wurde im Fachbereich Medizin unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Zachau angefertigt.
Ab 1976 studierte ich Humanmedizin, zunächst an der Universität Regensburg und ab dem SS 77 an der Universität München.Die Ärztliche Vorprüfung legte ich 1978 ab. Den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung legte ich 1979, den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung 1981 ab. Das Studium beendete ich nach dem Praktischen Jahr mit dem dritten Teil der Ärztlichen Prüfung im Mai 1982. Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter Leitung von Herrn Prof.Dr. H.G. Zachau in der Zeit von Mai 1976 bis August 1977 durchgeführt.
Seit Mai 1982 bin ich an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München in der Endokrinologischen Arbeitsgruppe (Leitung Frau Prof.Dr. R.C. Pickardt) als Wissenschaftlicher Assistent beschäftigt.